

**Methodische Versuche zur Bestimmung des
Luteinisierungshormons im Rinderblut
mit Hilfe eines Rezeptortests**

Rudolf Schindlmayr

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0048

Aus dem Institut für Physiologie
der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weißenstephan
der Technischen Universität München
Direktor: Professor Dr. Heinrich Karg

Methodische Versuche zur Bestimmung des
Luteinisierungshormons im Rinderblut
mit Hilfe eines Rezeptortests

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Rudolf Schindlmayr
aus Eichstätt

München 1973

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme
Referent: Prof. Dr. H. Karg
Korreferent: Prof. Dr. W. Leidl



Tag der Promotion: 22. Februar 1974

	Seite
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Vorbemerkung.....	1
1. Literatur.....	2
1.1. Wirkungsmechanismus der Proteohormone.....	2
1.2. Rezeptortest (RT) für LH.....	8
1.2.1. Sinn und Zweck.....	8
1.2.2. Nachweis der Rezeptorquellen und Re- zeptorgewinnung.....	11
1.2.3. LH/HCG-Bindung an den Rezeptor des Rattenhodens.....	13
1.2.4. Anwendung.....	16
2. Eigene Versuche.....	17
2.1. Material und Methode.....	17
2.1.1. Rezeptorgewinnung.....	17
2.1.1.1. Leydigzellensuspension (LZS)	17
2.1.1.2. Hodenhomogenat (HH) und Ho- mogenat anderer Organe.....	17
2.1.2. Markierung von Schaf-LH und HCG.....	19
2.1.3. Inkubation.....	19
2.1.4. Meßtechnische Auswertung.....	20
2.2. Ergebnisse.....	21
2.2.1. Standardkurve.....	21
2.2.1.1. Bindung von ¹²⁵ J-LH und ¹²⁵ J-HCG.....	21
2.2.1.2. Empfindlichkeit des Testsy- stems.....	21

2.2.1.3. Rezeptorkonservierung.....	23
2.2.1.4. Reproduzierbarkeit.....	24
2.2.2. Bindungsoptimum.....	25
2.2.2.1. pH-Wert.....	25
2.2.2.2. Inkubationszeit.....	25
2.2.2.3. Rezeptorkonzentration und Inkubationsvolumen.....	26
2.2.2.4. Variation des Rezeptorsus- pensionsvolumens bei gleich- bleibender Rezeptorkonzen- tration.....	27
2.2.3. Kreuzreaktionen.....	29
2.2.3.1. TSH, PRL, GH, FSH.....	29
2.2.3.2. LH-Analoga HCG und PMSG.....	29
2.2.4. Organspezifität.....	31
2.2.5. Artspezifität.....	33
2.2.6. Potenzvergleich verschiedener LH-Prä- parationen vom Rind und Vergleich der Ergebnisse mit denen aus OA-Test und RIT.....	35
2.2.7. Anwendung der RT-Methode für die LH- Bestimmung im Rinderserum.....	36
2.2.7.1. LH-Wiederfindung im Rinder- serum.....	36
2.2.7.2. Serumzusatz in verschiedener Verdünnung.....	38
2.2.7.3. Einfluß der einzelnen Serum- eiweißfraktionen auf die Bindung (Albumin, Alpha-, Beta-, Gammaglobulin).....	40
3. Diskussion.....	42

4. Zusammenfassung.....	52
5. Literaturverzeichnis.....	56
Lebenslauf.....	66

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GH	Wachstumshormon
GZM	Ganzzellenmethode
HCG	Choriongonadotropin vom Menschen
HH	Hodenhomogenat
hLH	Luteinisierungshormon vom Menschen
HVL	Hypophysenvorderlappen
ID	Diskriminationsindex
IE	Internationale Einheit
J	Jod
KHL	Krebs-Henseleit-Lösung
KIE	Kallikreineinheit
KRB	Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer
LH	Luteinisierungshormon
LZS	Leydigzellensuspension
MED	Minimale effektive Dosis
mIE	Internationale Millieinheit
m-RNS	Matritzen-Ribonukleinsäure
MSH	Melanophorenstimulierendes Hormon
NNR	Nebennierenrinde
OA-Test	Ovar-Ascorbinsäure-Test
PMSC	Serumgonadotropin tragender Stuten
PRL	Prolaktin

PTH	Parathormon
RIT	Radioimmunotest
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
r-RNS	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Rezeptortest
s	Standardabweichung
t-RNS	Transfer-Ribonukleinsäure
TSH	Thyroideastimulierendes Hormon
UB	Unspezifische Bindung
v	Variationskoeffizient
$\bar{x}$	Durchschnitt

V o r b e m e r k u n g

"Corpora non agunt nisi fixata" (Paul Ehrlich, 1854-1915). Wirkstoffe kommen im Organismus nur dann zur Entfaltung, wenn sie dort gebunden werden. Dies gilt für von außen zugeführte Stoffe nicht minder als für die vom Organismus selbst produzierten, wie es die Hormone sind. Es werden aber nicht irgendwelche Stoffe wahllos irgendwo gebunden, sondern jeweils bestimmte Stoffe in bestimmten Organen oder Organsystemen. Das setzt voraus, daß es dort spezifische Bindungseinrichtungen für bestimmte Agentien gibt, die sogenannten Rezeptoren.

Es fehlt nicht an Experimenten, die Rezeptoren für viele exogene (Pharmaka, Gifte) und endogene Wirkstoffe im Organismus nachzuweisen und das Geheimnis der molekularbiologischen Wirkungsweise der Rezeptoren zu lüften, oder die Rezeptoren zu isolieren und u.U. isoliert praktisch zu nutzen. Auch für das Luteinisierungshormon (LH) bzw. das menschliche Choriongonadotropin (HCG) wurden derlei Versuche in größerer Zahl mehr oder weniger erfolgreich angestellt, einesteils, um mehr allgemeine Kenntnisse über die Wirkungsweise dieser Hormone im Organismus zu gewinnen, andernteils vorzüglich, weil die herkömmlichen Meßsysteme für LH/HCG nur beschränkten Aussagewert über die wirklichen endokrinologischen Verhältnisse im Organismus haben.

Um zu klären, ob der Radioimmotest als derzeit empfindlichstes Nachweisverfahren das gesamte biologisch aktive LH im Serum erfaßt, war es das Ziel der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche, eine praktikable Testmethode für dieses Gonadotropin mit Hilfe isolierter Rezeptoren zu erstellen.

1. L i t e r a t u r

1.1. Wirkungsmechanismus der Proteohormone

Bevor wir uns näher mit dem Rezeptortest für LH und dem Wie und Warum befassen, erscheint es angebracht, ganz allgemein die Rezeptoren der Proteohormone und ihre Arbeitsweise zu betrachten.

Über die Natur dieser Rezeptoren wird Spezielles in der Literatur kaum berichtet. Wie aber unten noch weiter ausgeführt wird, sind sie Bestandteile der Zellmembran, jedoch ist ihre Struktur bisher noch nicht erforscht. Auch über den Bindungsmechanismus herrscht noch Unklarheit, obwohl man wenigstens für den Insulinrezeptor bereits auf dem Weg ist, Licht in dieses Dunkel zu bringen (Cuatrecasas, 1971).

Wesentlich mehr ist über die Lokalisation und die Wirkungsweise der Proteohormonrezeptoren bekannt. Beides läßt sich am besten nach dem Konzept vom "2nd messenger" (Sutherland und Robison, 1966) erklären (Abb. 1):

Trifft ein adäquater Stimulus die endokrine Drüse, wird das betreffende Hormon ausgeschüttet und an die Zellmembran gebunden. Als "1st messenger" aktiviert es die membrangebundene (Davoren und Sutherland, 1963) Adenylzyklase. Die Bindung der Adenylzyklase an die Zellmembran, zusätzlich auch die Feststellung, daß die Entfernung der Membranfraktion aus dem Testmedium die Hormonaktion zum Stillstand bringt (Rall et al., 1957), sowie die Tatsache, daß auch Hormone ihre volle physiologische Wirkung entfalten, wenn sie an Sepharose gekuppelt sind und daher nicht

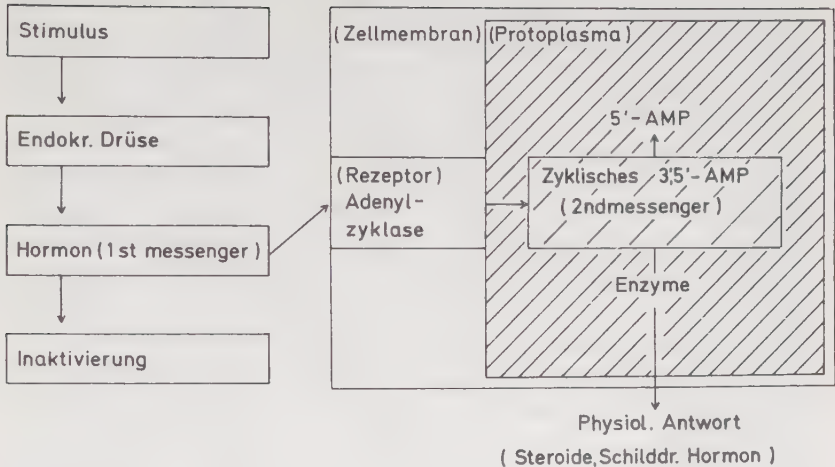


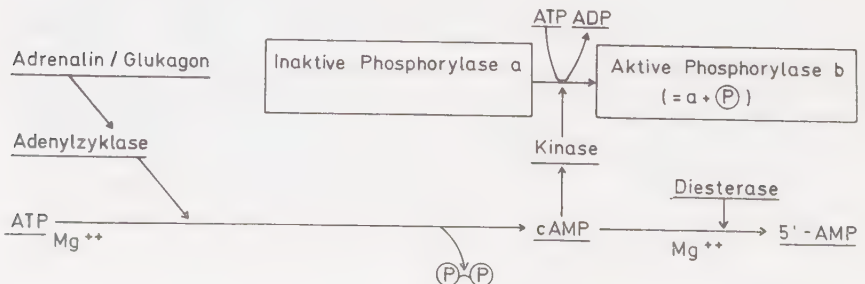
Abb. 1: Schematische Darstellung des Konzepts vom "2nd messenger" (modifiziert nach Sutherland und Robison, 1966)

in die Zelle eindringen können (Cuatrecasas, 1969; Dufau et al., 1971 a), dienen zum Nachweis dafür, daß die Rezeptoren der Proteohormone Bestandteile der Zellmembran oder wenigstens sehr eng mit ihr verbunden sind. Die Aktivierung der Adenylzyklase führt im Zellplasma zur Vermehrung eines hitzestabilen Faktors (Rall et al., 1957), ein aus Adenosintriphosphat (ATP) entstehendes Ribonukleotid (Sutherland und Rall, 1957; Sutherland und Rall, 1958), das als zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) identifiziert werden konnte (Lipkin et al., 1959) und durch eine Phosphodiesterase zu 5'-AMP abgebaut wird (Butcher und Sutherland, 1962). Das cAMP löst nun seinerseits als "2nd messenger" einen oder eine Reihe mehrerer zellulärer Prozesse aus, die in der Art eines "Kaskadenmechanismus" auf

die Aktivierung eines oder mehrerer Enzyme hinauslaufen. Da verschiedene Zellen über verschiedene Enzyme und Enzymsysteme gebieten, differiert auch das physiologische Endergebnis von einem Zelltyp zum anderen, z.B. Phosphorylaseaktivierung in der Leber¹, Steroidogenese in den Zellen der Nebennierenrinde (NNR) usw. Diese Art der Vermittlung von extra- nach intrazellulär ist inzwischen für Adrenalin und Glukagon (Haynes et al., 1960; Makman und Sutherland, 1964), sowie für das Luteinisierungshormon (LH) (Marsh et al., 1966), das adrenokortikotrope Hormon (ACTH) (Haynes, 1958; Haynes et al., 1960), Vasopressin (Orloff und Handler, 1967), das melanophorenstimulierende Hormon (MSH) (Bitensky und Burnstein, 1965), Parathormon (PTH) (Sutherland, 1972), das thyroideastimulierende Hormon (TSH) (Gilman und Rall, 1966), das follikelstimulierende Hormon (FSH) (Kuehl et al., 1970) und Prostaglandin E₂ (Marsh, 1970) gesichert. Andere Hormone allerdings, wie Insulin, senken den cAMP-Spiegel in der Zelle, um einige ihrer physiologischen Ziele zu erreichen. Eine Klärung dieses Mechanismus' steht noch aus (Sutherland, 1972).

Die membrangebundene Adenylzyklase könnte man sich eventuell dergestalt vorstellen, daß ihre Proteinkomponente aus zwei Untereinheiten besteht: Eine nach extrazellulär schauende Regulatoruntereinheit und eine katalytische Unterein-

¹) Die komplette Hormonaktion bei der Phosphorylaseaktivierung durch Adrenalin und Glukagon in der Leber hat, durch die chemische Lupe betrachtet, folgendes Aussehen (modifiziert nach Karlson, 1967):



heit, deren aktives Zentrum in Kontakt mit dem Zytoplasma steht, bilden das Enzym (Robison et al., 1967).

Wenn das Konzept vom "2nd messenger" keine reine Theorie bleiben soll, sind folgende vier Forderungen zu erfüllen: 1. Das Hormon muß die Adenylzyklase im Homogenat des Erfolgsorgans und/oder sedimentierbaren Fraktionen solcher Homogenate aktivieren; 2. das Hormon muß den cAMP-Gehalt intakter Zellen steigern; 3. fettlösliche cAMP-Derivate, wie Dibutiryl-cAMP oder auch cAMP selbst, müssen die Hormonaktion im Erfolgsorgan nachahmen können; 4. Inhibitoren des intrazellulären cAMP-Metabolismus (cAMP-Phosphodiesterase), wie Methylxanthine, z.B. Theophyllin, Theobromin, Koffein (Butcher und Sutherland, 1962) müssen die Hormonwirkung reproduzieren oder steigern (Sutherland et al., 1965). Zumindest bei der Wechselwirkung zwischen TSH und der Schilddrüse wird diesen Postulaten voll Genüge geleistet (Dumont et al., 1971).

Das zyklische 3',5'-AMP wird, wie Untersuchungen an NNR-Extrakten ergaben, spezifisch an ein Protein gebunden, das seinerseits wieder mit den Mikrosomen in sehr enger Beziehung steht (Gill und Garren, 1969). Die Autoren vermuten daher als Resultat des Wechselspiels zwischen dem mikrosomengebundenen Protein und dem Nukleotid, daß das cAMP eine Aktivierung der Proteinbiosynthese auf der Ebene der Matritzen-Ribonukleinsäure (m-RNS) vermittelt. Ein Teil der Spezifität des Nukleotids, so glauben sie, wird durch den 3',5'-Ring bedingt, da mit zyklischem 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP) bis zu einem gewissen Grad die cAMP-Bindung an das Protein verhindert werden konnte.

Die Größenordnung und die numerischen Verhältnisse der Rezeptoren wurden an Hand der ACTH-Rezeptoren in der NNR ausführlich durchleuchtet (Lefkowitz et al., 1971). So gibt es zwei Arten von ACTH-Rezeptoren mit verschiedenen

Dissoziationskonstanten und folglich Bindungskapazitäten, nämlich 5×10^{-15} bzw. 2×10^{-11} M ACTH/mg Protein im adrenalen Rezeptorextrakt. Daraus erschließen sich als Gesamtzahl der Rezeptoren etwa 60 der höheren Affinität und ungefähr 360000 niedrigerer Affinität je NNR-Zelle. Pro gebundenem ACTH-Molekül beträgt die cAMP-Produktion bei 37°C fünf bis zehn Moleküle in der Minute.

Zweierlei Affinität führt zu einer elastischen Reaktion des Erfolgsorgans gegen die Hormonausschüttung. Bei hoher Affinität werden die Rezeptoren schnell aufgefüllt, aber auch langsam entleert. Die durch diese Rezeptoren vermittelte Antwort hat mehr stetigen Charakter. Da sie schon bei geringer Hormonkonzentration im Serum gesättigt werden, tragen sie zu keiner weiteren NNR-Reaktion mehr bei, wenn der Serum-ACTH-Spiegel weiter steigt, während sich die Rezeptoren niedriger Affinität noch füllen, aber auch prompt wieder leeren, sobald die Hormonkonzentration nachläßt; ihre Antwort bleibt kurzlebig. Man nimmt an (Lefkowitz et al., 1971), daß zwei in ihrer Konzentration weit voneinander differierende Rezeptorordnungen die allgemeine Regel für die Rezeptorsysteme der Proteohormone darstellen, doch muß berücksichtigt werden, daß zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten die unspezifische Bindung unbeachtet blieb. Dazu schreiben Leidenberger und Reichert Jr. (1972 a): "Wenn man diese Korrektur (d.h. Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung, d. Verf.) nicht vornimmt, erscheinen zwei unterschiedliche Kurvenneigungen, die irrtümlicherweise zu dem Schluß führen, daß es hier zwei Rezeptorarten gibt."

Dieser Darstellung der Wechselwirkung zwischen dem Proteohormon und seinem Rezeptor sei kurz umrissen der Wirkungsmechanismus der Steroidhormone gegenübergestellt (gekürzt nach Frowein, 1972):

Das Steroidhormon dringt in die Zelle ein und wird von einem spezifischen zytoplasmatischen Rezeptorprotein gebunden. Dann beeinflusst es unmittelbar die Proteinbiosynthese: Entweder auf der Stufe der Translation im Zytoplasma, oder der Hormon-Rezeptor-Komplex wird in einem zweiten Schritt im Zytoplasma chemisch modifiziert und in den Kern geschleust, wo er seine Wirkung auf der Stufe der Transkription entfaltet. Auf beiden Stufen kann sich das Steroidhormon verschiedener Eingriffsmöglichkeiten bedienen.

Die Wege, die auf der Stufe der Transskription zum Ziel führen, konnte man bislang identifizieren als: Aktivierung der RNS-Polymerase; Neusynthese und/oder enzymatische Modifizierung der sauren Kernproteine (die möglicherweise mit Repressor- oder Derepressorfunktion betraut sind), was auf ihre Aktivierung hinausläuft; spezifische Bindung des Hormon-Rezeptor-Komplexes an saure Kernproteine der Erfolgszellen, woraus man - nach Vergleich mit den bekannten Gen-Regulationssystemen von Bakterien - auf eine Funktion als Antiterminationsfaktor der RNS-Polymerase schließen kann; vielleicht Genaktivierung durch Lockerung des DNS-Histon-Komplexes (Histone reprimieren aufgrund ihrer Bindung an die DNS die Transskription bestimmter DNS-Abschnitte); Aktivierung der Synthese und des Transports von Faktoren des proteinsynthetisierenden Apparates (m-RNS, t-RNS, r-RNS).

Auf der Stufe der Translation - im Zellplasma - sind folgende Möglichkeiten nachgewiesen oder stehen in der Diskussion: Beeinflussung der Polysomenbindung an die Membranen; Assoziation der Steroide mit spezifischen t-RNS-Molekülen, was den Verlust der Transportfähigkeit dieser Moleküle für Aminosäuren und somit die Hemmung der Proteinbiosynthese zur Folge hat.

Die Unterschiede in der Wirkungsweise der Proteo- und Ste-

roidhormone kann man demgemäß so definieren, daß die Pro-
teohormone indirekt, über das cAMP als "2nd messenger",
die Steroidhormone dagegen direkt, durch den unmittelbaren
Eingriff in die Proteinbiosynthese, das biologische Ge-
schehen im Organismus beeinflussen.

1.2. Rezeptortest (RT) für LH

1.2.1. Sinn und Zweck

Um das Luteinisierungshormon (LH) nachzuweisen oder um die
LH-Aktivitäten verschiedener Hormonpräparationen miteinan-
der zu vergleichen, bediente man sich bisher sowohl des
Bio- (in vivo) als auch des Radioimmunotests (RIT) (in vit-
ro).

Beim Biotest stehen neben anderen im wesentlichen zwei
Verfahren zur Auswahl: Der Ovar-Ascorbinsäure-Test (Karg,
1957; Parlow, 1958) als direkte Methode und der Gewichts-
test der ventralen Prostata (Greep et al., 1941) als indi-
rekte Methode.

Der Ovar-Ascorbinsäure-Test (OA-Test) beruht auf der Ab-
nahme der Ascorbinsäurekonzentration im luteinisierten
Rattenovar, der Gewichtstest der ventralen Prostata (Pro-
statagewichtstest) auf der Gewichtszunahme des ventralen
Prostataanteils beim hypophysektomierten Rattenbock nach
parenteraler LH-Applikation als Folge der LH-stimulierten
Androgenproduktion in den Leydigischen Zwischenzellen.

Die Reaktionen beim Biotest erfolgen artunspezifisch. Hor-
monpräparationen verschiedener Tierspezies können an ein
und derselben Versuchstierart erprobt werden.

Die Problematik des Biotests in vivo liegt in der Schwierigkeit, die Konzentration des wirklich biologisch aktiven Hormons wiederzugeben. Biotests in vivo können keine Aussagen machen über die Bindungsaktivität der Gonadotropine. So beeinflusst beispielsweise der Neuraminsäuregehalt die Metabolisierungsrate und die biologische Halbwertszeit der Gonadotropine (Van Hall et al., 1971 a). Dies hat zur Folge, daß die sichtbare biologische Aktivität von neuramindasebehandeltem HCG im OA-Test auf weniger als 1 % (Van Hall et al., 1971 b), die von Human-LH (hLH) auf 16-12 % (Braunstein et al., 1971) reduziert wird. Demgegenüber wiegen die Nachteile, die die Aufwendigkeit der gebräuchlichen Biotestmethoden mit sich bringt (Prostatagewichtstest: Hypophysektomie der Versuchstiere; OA-Test: Luteinisierung der Rattenovarien, sechs bis zehn Versuchstiere pro Dosierung, Extraktion) relativ gering.

Die andere Methode zur LH-Bestimmung ist der Radioimmuno-test (RIT). Er baut auf dem erstmals 1959 von Yalow und Berson für die Insulinbestimmung beschriebenen Prinzip auf. Die Bindung von radioaktiv markiertem Standardhormon an einen spezifischen Antikörper wird kompetitiv durch das nicht markierte Hormon in der Testsubstanz gehemmt. Der RIT geht aber mit immunologischer Spezifität einher, die seine Anwendung zur Messung desselben Hormons bei einer anderen Tierspezies begrenzt. So reagierten Antikörper gegen bovines LH nur mit LH von Rind, Schaf und Schwein (Reichert Jr. und Treadwell, 1967). Doch arbeitet das Testsystem mit hoher Empfindlichkeit (noch 50 pg LH/Inkubationsansatz sind zu erfassen gegenüber 0,3 µg/Ratte im OA-Test), und Extraktionsverfahren sind nicht nötig; deswegen kommt man mit sehr geringen Serummengen aus, wodurch häufige Blutentnahmen für die untersuchten Tiere keine Belastung darstellen (Karg et al., 1969). Auch sehr große Probenmengen (zwei bis drei Tests/Woche mit je 400 bis 500

Proben ohne und bis 1000 mit Pipettierautomatik bei zwei Personen techn. Personal) können bequem verarbeitet werden. Das einmal gewonnene Antiserum ist tiefgefroren lange Zeit konservierbar und recht ausgiebig, da es in einer Endverdünnung von z.B. 1:150000 verwendet wird (Erfahrungen im eigenen Labor). Die immunologischen Eigenschaften werden nicht durch Strukturvariationen wie Desialinisierung (Neuraminsäureentzug) beeinflusst (Van Hall et al., 1971 b), wahrscheinlich aber auch nicht durch biologische Aktivität oder Inaktivität des getesteten Gonadotropins, so daß die immunologische keinen Aufschluß über die biologische Aktivität geben muß (Catt et al., 1971).

Durch die Entwicklung des Rezeptortests (RT) für LH sollen nun die Vorteile von Biotest und RIT kombiniert werden. Das Prinzip des RTs beruht auf der von Lefkowitz et al. (1970) beschriebenen Möglichkeit der Bindung von radioaktiv markiertem Hormon an den Rezeptor und der kompetitiven Bindungshemmung durch kaltes Hormon in vitro. Der RT arbeitet empfindlicher und präziser als herkömmliche Biotests und ist bequemer zur Messung großer Probenzahlen geeignet (Catt et al., 1972 a). Die Aktivität von Hormonen kann an den Zellen des Erfolgsorgans direkt ausgewertet werden ohne die schwankende Wirkung des Metabolismus in vivo. So werden die desialinisierten Gonadotropine, deren biologische Aktivität im OA-Test drastisch sinkt (s.o.), eher noch heftiger an ihre Erfolgsorgane gebunden als die intakten Präparationen, so daß etwa ein Rückgang der Steroidogenese in vitro kaum zu beobachten ist (Dufau et al., 1971 b). Auch erfaßt der Rezeptor nur die biologisch aktive Hormonkonformation, wie man - mit allen bei Analogschlüssen angebrachten Vorbehalten - aus den Ergebnissen von Versuchen mit ^{125}J -ACTH entnehmen darf. Sobald chemisch modifizierte ACTH-Derivate nicht mehr fähig sind, Adenylzyklase zu aktivieren, bleibt die Bindung an den Re-

zeptor aus (Lefkowitz et al., 1971). Ebenso reagieren Leberzellrezeptoren auf biologisch inaktives Insulin (Cuatrecasas et al., 1971).

Für die Östrogen- und ACTH-Messung ist die Rezeptormethode bereits Routine geworden (Korenman et al., 1970; Lefkowitz et al., 1970). Auch für Prolaktin (PRL) und andere laktogene Hormone (laktogenes Hormon aus der menschlichen Plazenta = hPLH; menschliches Wachstumshormon = hGH) wurde jüngst ein brauchbarer RT entwickelt (Shiu et al., 1973). Außer über die unten noch genauer beschriebenen Versuche mit LH-Rezeptoren wird auch über Arbeiten an solchen mit Rezeptoren für Insulin (Cuatrecasas, 1971) und FSH (Means und Vaitukaitis, 1972) berichtet.

1.2.2. Nachweis der Rezeptorquellen und Rezeptorgewinnung

Die Voraussetzung für ein Arbeiten mit LH-Rezeptoren in vitro ist ihre erfolgreiche Isolierung. Die autoradiographische Untersuchung weiblicher Ratten und Mäuse (Rajaniemi und Vanha-Perttula, 1972) und von Schnitten luteinisierten Rattenovarien (Lee und Ryan, 1971) zeigte eine durch kaltes LH und HCG kompetitiv zu hemmende spezifische Bindung von ^{125}J -LH nur im Gelbkörper und in den Zellen der Theca follicularis. Catt et al. (1972 a) sowie Leyendecker et al. (1973) fanden im (homogenisierten) Ovar der pseudograviden Ratte eine spezifische, durch kaltes HCG kompetitiv hemmbare ^{125}J -HCG-Bindung, ähnlich, wie bei Verwendung von Hodenhomogenat (Catt et al., 1972 a). Das Schweineovar bindet ^{125}J -HCG spezifisch auch in den Granulosazellen (Kammerman et al., 1972).

Im Organismus der männlichen Ratte wird LH in dosisabhängiger Höhe ausschließlich von den Leydigischen Zwischenzellen des Hodens gebunden (De Kretser et al., 1969). Die

Bindung von ^{131}J -LH an Rattenhodenhomogenat (maximal 6-10 % nach 60' Inkubationszeit in 37°C bei 1 ml Homogenat und 2 ml Puffer/g Gewebe) nimmt bei Zugabe von kaltem LH ab (De Kretser et al., 1971). Eine Bindung von markiertem HCG ist in getrennten Zwischenzellfraktionen von 120 bis 100000 g nachzuweisen (Catt et al., 1972 a).

Aufbauend auf diesen Feststellungen entwickelten Catt et al. (1971) das erste Modell eines RTs für LH.

Die Leydigischen Zwischenzellen des Rattenhodens liegen in den jeweils von drei bis vier Tubuli begrenzten Bindegewebskeilen in Trauben von fünf bis zwanzig Stück oder in Strängen (Tillinger, 1957). Als LH/HCG-bindende Fraktion isoliert man entweder die Leydigzellen im ganzen (Catt et al., 1971) oder man verwendet subzelluläre Fragmente (Catt et al., 1972 a; De Kretser et al., 1971; Leidenberger und Reichert Jr., 1972 a).

Um die Leydigzellen im ganzen zu isolieren, werden die von der Tunica albuginea befreiten Hoden in Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer (KRB) zerrupft, anschließend durch Watte filtriert und zweimal nachgewaschen. Die so erhaltene Leydigzellensuspension (LZS), in der auch subzelluläre Fragmente enthalten sind (Catt et al., 1972 a), wird bei 4°C und 2000 g 10' lang zentrifugiert. Die als Sediment erhaltenen Zellen werden schließlich in 5 ml KRB/Hoden aufgeschwemmt. Ähnlich verläuft die Gewinnung der subzellulären Fragmente: Zuerst wird das Filtrat bei 120 g zentrifugiert, um die intakten Zellen zu entfernen, dann, zur weiteren Präparation der Subzellulärfraktion bei 1500 (Catt et al., 1972 a) oder 2000 g (Leidenberger und Reichert Jr., 1972 a) und das Sediment in Puffer aufgeschwemmt, wie es die Verwendung erfordert. Vereinfacht wird die Gewinnung der subzellulären Fraktion durch Homogenisieren des dekapsulierten Hodens. Anschließend zieht man entweder das zur

Entfernung überflüssiger Gewebsrückstände durch Glaswolle gefilterte Homogenat ohne weitere Bearbeitung zur Verwendung im RT heran (De Kretser et al., 1971; Leidenberger und Reichert Jr., 1972 a), oder man nimmt wieder das 1500-g-Sediment, aufgeschwemmt in 10 ml Phosphatpuffer je Hoden (Catt et al., 1972 a).

1.2.3. LH/HCG-Bindung an den Rezeptor des Rattenhodens

Die Homogenatmethode ist nach Catt et al. schneller und bequemer durchzuführen als die andere Methode und bringt identische Ergebnisse, was auch von Leidenberger und Reichert Jr. bestätigt wird. Die Ausbeute an Bindungsaktivität übertrifft die der Zwischenzellenfraktion allein. Die Entfernung der intakten Zellen und die weitere Präparation des Rezeptormaterials - wie oben beschrieben - führen ihrerseits zu einer signifikanten Bindung von ^{125}J -LH und -HCG mit erhöhter Empfindlichkeit für die Verdrängung des markierten durch nicht markiertes Hormon am Rezeptor. Das Ausmaß der Gonadotropinbindung an den Rezeptor ist aber noch von mannigfachen anderen Faktoren abhängig: Von der Hormonmarkierung (Leidenberger und Reichert Jr., 1972 a), der Inkubationszeit und -temperatur (Catt et al., 1972 b), vom pH-Wert und von der Ionenstärke (Leidenberger et al., 1973), sowie dem Ca-Spiegel des Mediums und vom Waschen des Homogenats (Catt et al., 1972 b); keinerlei Einfluß üben der Puromycin- und der Glucosegehalt des Inkubationsmediums (Catt et al., 1971) oder der Neuraminsäuregehalt von LH/HCG (Dufau et al., 1971 b; s.o.) auf die Bindungsrate aus.

Bei der nach der Chloramin-T-Methode (Greenwood et al., 1963) durchgeführten Hormonmarkierung mit radioaktivem Jod wird die Bindungsaktivität sowohl durch die Einwirkungs-

zeit des Chloramins auf das Hormon als auch durch das Dosisverhältnis Chloramin T/Hormon beeinflusst. Zu viel Chloramin T und eine zu lange Einwirkungszeit haben eine der Bindung abträgliche Wirkung.

Die Auswirkung von Inkubationszeit und -temperatur auf die Bindung sind eng miteinander verknüpft. Je niedriger die Inkubationstemperatur ist, desto langsamer geht die Bindung vonstatten, jedoch wird die größtmögliche Bindung eher bei niedrigeren Temperaturen (Zimmertemperatur) erreicht. Ist die Bindung auf einem gewissen Plateau angelangt, geht sie langsam wieder zurück.

Zwischen pH 5,5 und pH 7,5 herrscht kaum ein Unterschied in der Bindungshöhe. Das Maximum liegt bei 7,0, ähnlich, wie bei den Beziehungen zwischen Insulin und isolierten Fettzellen (Cuatrecasas, 1971).

Die Ionenstärke zwischen 0,05 und 0,1 M ermöglicht die höchste Bindungsrate; Cuatrecasas fand dagegen bei Erhöhung der Ionenstärke bis 2,0 M eine kontinuierlich zunehmende Insulinbindung an isolierte Fettzellen (1971).

Wiederholtes Waschen des Homogenats senkt die Bindung in ganz geringem Ausmaß.

Der Ca-Gehalt des Mediums beeinflusst zwischen null und dem doppelten physiologischen Spiegel die Gonadotropinbindung an den Rezeptor nicht; erst bei extrem hohen Ca-Konzentrationen offenbart sich, wie bei den NNR-Rezeptoren und ACTH auch (Lefkowitz et al., 1971), ein die Bindung mäßiger Einfluss.

Der Hormon-Rezeptor-Komplex dissoziiert bei Erniedrigung des pH-Wertes auf 5,0, bei Steigerung der Ionenstärke des Mediums auf mindestens 1,0 M und schließlich bei einem sehr hohen Überschuß an kaltem Hormon, doch findet dabei nicht die vollständige, in einem frei reversiblen System

zu erwartende Dissoziation statt (Leidenberger et al., 1973), wie beispielsweise beim ACTH-Rezeptor-Komplex (Lefkowitz et al., 1971). Daher werden zwei Phasen des LH-Rezeptor-Komplexes postuliert: Eine, die im Gleichgewicht mit freiem Rezeptor und Hormon steht, die andere, deren Formierung durch irgendeinen Schritt im Bindungsmechanismus irreversibel ist. Während der Bindung an den Rezeptor wird die Bindungs- (Dufau et al., 1972; Leidenberger et al., 1973) und gonadotrope Aktivität (Dufau et al., 1972) von LH/HCG in keiner Weise beeinträchtigt.

Unter unspezifischer Bindung (UB) versteht man die Aufnahme von markiertem Hormon, die nicht durch Präinkubation des Rezeptors mit einer das markierte Hormon um das Tausendfache übertreffenden Menge von kaltem Hormon verhindert werden kann (Leidenberger und Reichert Jr., 1972 a). Sie unterscheidet sich durch besondere Eigenschaften von der spezifischen Bindung (Leidenberger et al., 1973): Die UB steigt kontinuierlich mit zunehmendem Hormonangebot, ist also kein Sättigungsprozeß, und ihr Ausmaß ist erst über 37°C abhängig von der Inkubationstemperatur. Nach etwa 15' Inkubation ist der Prozeß der UB abgeschlossen. Bei Schädigung des Hormons wie auch des Rezeptors nimmt sie zu, ebenso bei niedriger Ionenstärke und niedrigem pH des Mediums.

Bei Anwesenheit zunehmender Mengen von kaltem LH oder HCG wird das markierte Gonadotropin progressiv vom Rezeptor verdrängt (Catt et al., 1971). Die Höhe der minimal effektiven Dosis (MED) und die Bandbreite, in der die schrittweise Bindungshemmung des markierten Hormons abläuft, sowie die Kurvenneigungen schwanken von Präparation zu Präparation, so von 5 bis 1000 ng Schaf-LH, 5 bis 500 mIE HCG und 1 bis 100 ng hLH (Catt et al., 1972 a). Zum Vergleich dazu: Die MED liegt im ACTH-RT bei 1 pg (Lefkowitz et al.,

1970), im PRL-RT bei 5 ng ohne und 20 ng mit Serumzusatz (Shiu et al., 1973). Die Empfindlichkeit der Standardkurven ist temperaturabhängig und am höchsten bei Zimmertemperatur (Catt et al., 1972 b). Sie nimmt auch bei einer Verdünnung der Rezeptoraufschwemmung zu, wenigstens, wenn die LZS verwendet wird (Catt et al., 1971).

Die Hodenrezeptoren reagieren LH/HCG-spezifisch; LH-Aktivitäten, die sich bei den HVL-Hormonen FSH und TSH (Catt et al., 1971 und 1972 a; Leidenberger und Reichert Jr., 1972 a), sowie bei GH (Catt et al., 1972 a) zeigten, waren von den Autoren bei denselben Hormonpräparationen auch im Biotest festgestellt worden und sind nach ihrer Ansicht auf Verunreinigungen mit LH zurückzuführen. Zwischen PRL und den LH-Rezeptoren gab es keine Kreuzreaktion (Catt et al., 1972 a).

1.2.4. Anwendung

In der ersten und bisher einzigen Beschreibung einer praktischen Anwendung sieht man den LH-RT als Methode zum Potenzvergleich verschiedener menschlicher Hypophysenfraktionen, da Vergleiche zwischen OA- und Prostatagewichtstest einerseits und RT andererseits je Testmethode ziemlich einheitliche Diskriminationsindices für die einzelnen Hypophysenfraktionen ergeben und die Reihenfolge in der Aktivität in jedem System ähnlich ist, vom desialinisierten hLH abgesehen (Leidenberger und Reichert Jr., 1972 b).

2. Eigene Versuche

2.1. Material und Methode

2.1.1. Rezeptorgewinnung

Die Leydigzellensuspension (LZS) und das Hodenhomogenat (HH) wurden leicht modifiziert nach den von Catt et al. 1971 und 1972 (a) beschriebenen Methoden gewonnen.

Wenn die Pufferart nicht besonders beschrieben ist, handelt es sich um 0,05 M Phosphatpuffer (PO_4 -Puffer), pH 7,5.

2.1.1.1. Leydigzellensuspension (LZS)

Ratten von ca. 450 g Körpergewicht wurden unter Chloroform- oder Äthernarkose kastriert, die Hoden in kaltem Puffer aufgefangen. Nach Entfernen der Tunica albuginea wurden die Tubuli seminiferi sorgsam in kaltem Puffer zerupft. Dann wurde die Tubulienaufschwemmung durch Glaswolle gefiltert und zweimal mit Puffer nachgewaschen. Die so gewonnene LZS wurde dann bei 1000 rpm und 4°C für 10' zentrifugiert. Nach dem Abhebern des Überstandes wurde der aus den gereinigten Leydigzellen bestehende rötliche Bodensatz in 3 ml kalter Krebs-Henseleit-Lösung (KHL)/Hoden aufgeschwemmt. Der KHL fehlten NaHCO_3 und MgCl_2 , der pH war auf 7,5 eingestellt.

2.1.1.2. Hodenhomogenat (HH) und Homogenat anderer Organe

Die Rattenhoden wurden wie in 2.1.1.1. gewonnen. Nach Entfernen der Tunica albuginea wurde das verbleibende Hodengewebe mit kaltem Puffer im "Potter"¹ bei voller Tourenzahl

¹) Glaszylinder mit rotierendem, genau eingeschliffenem Glas- oder genau eingepaßtem Teflonstopfen. Der Zylinder hängt in einen Behälter mit Kühlmedium.

(1500 rpm) homogenisiert. Auf diese Weise wurden auch die Organe vom Rind: Leber, Niere, Hoden, Samenleiterampulle, Gelbkörper und Hypophyse verarbeitet. Für die relativ bindegewebsarmen Organe Leber, Niere, Gelbkörper, Hypophyse (und Rattenhoden) genügte der Teflonstopfen. Die ein wenig derberen Gewebe von Stierhoden und Samenleiterampulle mußten dagegen mit dem Glasstopfen sozusagen erst "grob" und anschließend noch mit dem Teflonstopfen "fein" homogenisiert werden. Der Glasstopfen wurde mit diesen Organen viel schneller fertig, aber erst nach der weiteren Behandlung mit dem Teflonstopfen verschwanden jegliche mit dem bloßen Auge sichtbaren Flocken, soweit sie nicht reine Bindegewebsbestandteile waren. Die bindegewebsreicheren Organe Muskel, Samenblasendrüse, Prostata, Eierstock und Endometrium konnten nur mit dem "Ultraturrax"¹ homogenisiert werden. Auch das so hergestellte Homogenat wurde zweckmäßigerweise noch einmal im "Potter" mit dem Teflonstopfen feingearbeitet. Anschließend wurde es durch eine dünne Glaswollschicht gefiltert, um eventuell noch vorhandene, nicht zerkleinerte Bindegewebssteile zu entfernen. Das Filtrat wurde dann bei 1500 g und 4°C für 20' zentrifugiert, der Überstand abgehebert und das Sediment in kaltem Puffer im Verhältnis 10 ml/2 g Gewebe resuspendiert. Dieses Verdünnungsverhältnis gilt für Ratten- und Stierhoden. 2 g sind das bei 100 Wägungen auf der Präzisionswaage festgestellte Durchschnittsgewicht des Hodens eines erwachsenen Rattenbockes von ca. 450 g Körpergewicht. Die Homogenate aller anderen Organe wurden im Verhältnis 5 ml/2 g Gewebe aufgeschwemmt.

Die 1500-g-Fraktion wurde gewählt, da sie mit dem gewöhnlichen Ausschwingrotor für sehr hohe Probenzahlen bequem herunterzuzentrifugieren ist, um später den Hormon-Rezep-

¹) Der "Ultraturrax" zerkleinert das Substrat mit einem schnell rotierenden Messer.

tor-Komplex vom freien Hormon zu trennen. Es ist empfehlenswert, beim Zentrifugieren des Filtrats von vornherein etwas unter der zur Trennung erreichbaren g-Zahl zu bleiben, um möglichen Ungenauigkeiten (Tourenzählung, Füllungsgrad der Zentrifugenbecher, Ablesefehler) vorzubeugen.

2.1.2. Markierung von Schaf-LH und HCG

Die Hormonmarkierung wurde modifiziert nach der Chloramin-T-Methode (Greenwood et al., 1963) durchgeführt. Auf 5 μg LH/HCG kommen ca. 1 mCi Na^{125}J . Dann werden 50 μg Chloramin T in 25 μl Puffer zugefügt. Nach 20" Schütteln wird die Reaktion durch Zugabe von 80 μg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Natriummetabisulfit) in 0,4 ml Puffer beendet. Dem zur Markierung verwendeten Puffer sind EDTA und Humanalbumin zugesetzt. Die erste Reinigung des markierten Hormons geschieht über eine Sephadex-G-50-Säule. Nach Verwerfung des ersten Peaks wird der zweite milliliterweise in silikonisierten Gläsern mit einer Vorlage von 2 mg Humanalbumin in 0,1 ml aufgefangen. Die zweite Reinigung wurde am Tag der Inkubation oder am Abend zuvor über eine Zellosesäule vorgenommen. Das Hormon aus der ersten Reinigung wird aufgetragen, der erste Peak verworfen, der zweite (das aktive Hormon) mit Pferdeserum, das 1:1 mit einfachem, 0,01 M PO_4 -Puffer, pH 7,5, verdünnt ist, aus der Säule gewaschen und zur Inkubation verwendet.

Nach der Markierung und nach der zweiten Reinigung wird das Hormon im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.1.3. Inkubation

In kleine Plastikinkubationsröhrchen kamen zunächst 0,1 ml

Standardlösung (beim Blindwert reiner Puffer), einige zehn- bis hunderttausend Impulse ^{125}J -Hormon (in 0,1 ml), 200 KIE (0,02 ml) Trasylol (Enzyminhibitor) und zuletzt 0,5 ml HH oder 1,0 ml LZS. Im Wasserbad bei 37°C wurden die Proben 210' lang geschüttelt (Frequenz: 140/min). Jede Probe war dreifach angesetzt.

2.1.4. Meßtechnische Auswertung

Nach der Inkubation wurde jedes Röhrchen auf ca. 2 ml Inhalt mit kaltem Puffer aufgefüllt, um die Radioaktivität zu verdünnen. Anschließend wurden die Proben bei etwa 2000 g und 4°C für 20' zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurden die Teströhrchen mit dem sedimentierten Hormon-Rezeptor-Komplex kopfüber zum Abtropfen aufgestellt und Resttropfen mit Zellstoff ausgewischt. Dann erfolgte die Messung der Restaktivität im automatischen Gammazähler.

Aus der Restaktivität in den Inkubationsröhrchen wurden die Ergebnisse ermittelt in % absolute Bindung und % relative Bindung. Die absolute Bindung drückt aus, wieviel Prozent des zugegebenen markierten Hormons vom Rezeptor gebunden werden. Bei der relativen Bindung gilt der Blindwert der Standardkurve oder ein bestimmter Kontrollwert gleich 100 % Bindung.

2.2. Ergebnisse

Da aus grundsätzlichen Erwägungen, die in der Diskussion (3.) ausführlich auseinandergesetzt sind, zur Rezeptorgewinnung in erster Linie die Homogenatmethode zur Anwendung kam, wurden die im Folgenden besprochenen Ergebnisse, soweit nicht speziell auf die Verwendung der LZS (nach der GZM gewonnen) hingewiesen ist, mit HH erzielt.

2.2.1. Standardkurve

2.2.1.1. Bindung von $^{125}\text{J-LH}$ und $^{125}\text{J-HCG}$

Beim ersten Versuch wurde ^{125}J -markiertes LH verwendet. Es gelang nicht, eine unspezifische Bindung von 0,8 % zu überschreiten, unspezifisch deshalb, weil gleichfalls zugesetztes kaltes LH das gebundene markierte Hormon am Ort seiner Bindung nicht ersetzen konnte. In einem gleichzeitig durchgeführten LH-RIT war das $^{125}\text{J-LH}$ aus derselben Charge tadellos verwendungsfähig. Im Gegensatz zum markierten LH wurde $^{125}\text{J-HCG}$ spezifisch an den Rezeptor gebunden. Steigende Zugaben von kaltem LH ersetzten zunehmend das markierte Hormon. Ebendasselbe Phänomen trat auch bei der GZM auf. Die mit HH und $^{125}\text{J-HCG}$ erhaltene Standardkurve zeigt Abb. 2.

Bei 19 Versuchen unter denselben Bedingungen schwankte die absolute Bindung zwischen 14,9 und 36,8 % ($\bar{x}$ 24,8 %).

2.2.1.2. Empfindlichkeit des Testsystems

Die sichere Empfindlichkeitsgrenze (Nachweis der geringsten Menge von kaltem Hormon) des Testsystems lag bei 20 ng LH ($\text{NIH}^1\text{-LH-B}_8$; biol. Aktivität: $1,03 \times \text{NIH}^1\text{-LH-S}_1$).

¹) NIH: Hormonstandards der National Institutes of Health, Bethesda, Md., USA

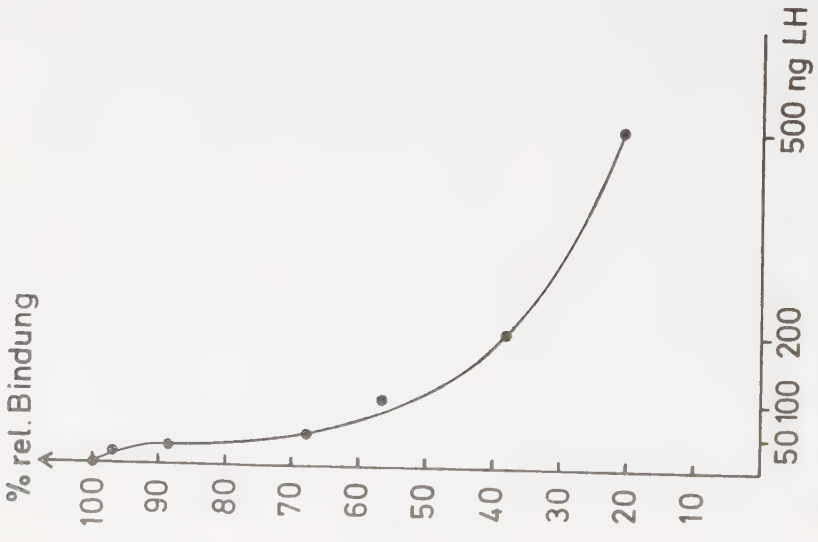


Abb. 2: Standardkurve für LH (NIH-LH-B₆); absol. Bindung: 30,9 μ

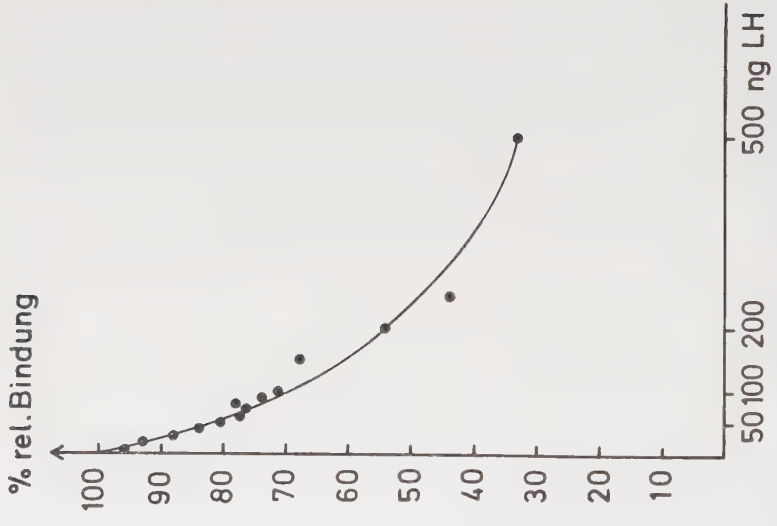


Abb. 3: Standardkurve für LH (NIH-LH-B₆); bis 100 ng Meßwerte im Abstand von 10 ng eingetragen (absol. Bindung: 21,9 μ)

Dauer der Konservierung in Tagen	% rel. Bindung bei: frischem Rezeptor	konserv. Rezeptor	Rel. Unter- schied in %
45	23,6	13,6	42,4
71	4,7	3,0	36,2
108	14,9	9,1	38,9
115	18,6	12,4	33,3
122	28,5	16,0	43,9

Tab. 1: Bindungsvergleich zwischen frischen und konservierten Rezeptoren

Werte unter 20 ng lagen gewöhnlich außerhalb des Meßbereiches; nur in einem Fall waren 10 ng noch nachzuweisen. Bis 100 ng ließen sich Abstände von 10 ng deutlich feststellen (Abb. 3). Der gesamte Meßbereich liegt zwischen 20 und 500 ng LH (NIH-LH-B₈).

2.2.1.3. Rezeptorkonservierung

Die Rezeptorsuspension wurde in der zur Verarbeitung notwendigen Konzentration (10 ml Puffer/Rattenhoden) in jeweils für eine Standardkurve notwendige Portionen abgefüllt und anschließend auf -24°C eingefroren. Sämtliche Standardkurven des Rezeptorkonservierungsversuches entstanden so mit derselben Rezeptorquelle. Unmittelbar vor der Inkubation wurden die Portionen jeweils im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut und im "Potter" kurz noch einmal homogenisiert, da - offenbar durch das Einfrieren - Agglomerationen im Homogenat auftraten. Die Inkubationen fanden in folgenden Zeitabständen vom Tag der Gewinnung statt: 8, 17, 38, 45, 52, 71, 108, 115, 122 Tage. Die Kurve nach acht Tagen Konservierung (50 %-Intercept¹: 262,5 ng) war die unempfindlichste, die nach 122 Tagen, also nach rund vier Monaten, die empfindlichste Kurve überhaupt (50 %-Intercept¹: 32,5 ng). Bei gleichem ¹²⁵J-Hormonansatz mitge-

¹) s. 2.2.1.4.

testete frischgewonnene Rezeptoren gehörten immer einer anderen Charge an als die konservierten. Die absolute Bindungsfähigkeit frischgewonnener Rezeptoren lag in fünf Vergleichsversuchen höher als die der konservierten, und die Diskrepanz bleibt auf die Dauer gleich, wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist. Der durchschnittliche Unterschied beträgt $38,9 \% \pm 4,35 \%$ (v 10,99 %).

2.2.1.4. Reproduzierbarkeit

Als Kriterium für die Reproduzierbarkeit diente die 50 %-Intercept-Marke; sie gibt an, bei wieviel ng kaltem Hormon eine relative Bindung von 50 % des markierten Hormons erreicht wird.

Bei Berücksichtigung von zwölf verschiedenen Rezeptorchargen lag der mittlere 50 %-Intercept bei $76,25 \text{ ng} \pm 25,39 \text{ ng}$ (v 33,28 %); das $^{125}\text{J-HCG}$ wurde dabei aus vier verschiedenen Markierungen bezogen. Dem stehen $83,75 \text{ ng} \pm 23,77 \text{ ng}$ (v 28,38 %) bei sechs Versuchen mit konserviertem Rezeptor, also immer derselben Rezeptorcharge, und Hormon aus drei verschiedenen Markierungen gegenüber. Im dritten Vergleich stehen, ohne Rücksicht auf gleiche oder verschiedene Rezeptorchargen, die ermittelten Werte bei den jeweils mit $^{125}\text{J-HCG}$ aus derselben Markierung durchgeführten Versuchen; die Abweichungen sind also nur durch individuelle Unterschiede bedingt:

1. Markierung: $\bar{x}$ 119,1 ng; $s \pm 11,81 \text{ ng}$; v 9,91 %;
2. Markierung: $\bar{x}$ 68,5 ng; $s \pm 30,24 \text{ ng}$; v 44,14 %;
3. Markierung: $\bar{x}$ 73,3 ng; $s \pm 18,16 \text{ ng}$; v 23,80 %;
4. Markierung: $\bar{x}$ 74,0 ng; $s \pm 11,31 \text{ ng}$; v 15,28 %;
- $\emptyset s \pm 17,88 \text{ ng}$; v 23,28 %;

Standardabweichung (s) und Variation (v) liegen bei gleichem markiertem Hormon und verschiedenem Rezeptor wesentlich niedriger als bei gleichem Rezeptor und verschiedenem markiertem Hormon. Am höchsten liegen die Werte schließ-

% absol. Bindung

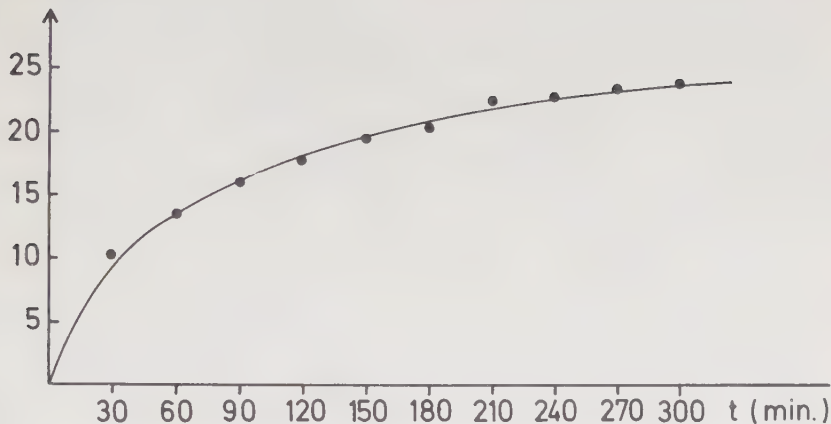


Abb. 4: Auswirkung der Inkubationszeit auf die Bindung von ^{125}J -HCG an den Rezeptor im Rattenhodenhomogenat bei 37°C Inkubationstemperatur

lich, wenn individuelle und Markierungsunterschiede zusammenkommen.

Die durchschnittliche Standardabweichung innerhalb der Dreifachbestimmungen lag bei 60 Proben (also 180 Werte) bei 1,77 %, der durchschnittliche Variationskoeffizient bei 3,04 %.

2.2.2. Bindungsoptimum

2.2.2.1. pH-Wert

Es wurde die Bindung bei pH 7,5 und pH 3,95 festgestellt und verglichen. Sie betrug 28,6 % bzw. 4,6 %, ein Unterschied von 83,8 %.

2.2.2.2. Inkubationszeit

Den Einfluß verschiedener Inkubationszeiten von null bis 300' auf den Grad der Bindung zeigt Abb. 4. Die Temperatur

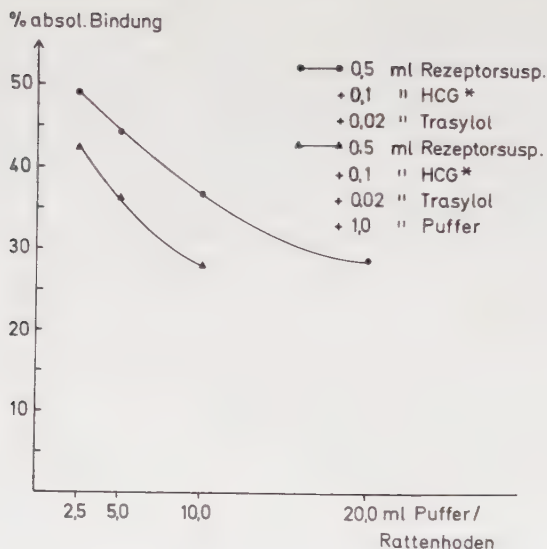


Abb. 5: Bindung von ^{125}J -HCG an den Rezeptor im Rattenhodenhomogenat in Abhängigkeit von Rezeptorkonzentration und Inkubationsvolumen

betrug bei diesem Versuch durchweg 37°C . Das Ergebnis stimmt mit dem bei der GZM erhaltenen insoweit überein, als auch dort die Bindung bis 210' zunimmt, bei längerer Inkubation allerdings wieder absinkt, während hier selbst nach 300' noch kein Plateau erreicht ist.

2.2.2.3. Rezeptorkonzentration und Inkubationsvolumen

Die Änderung des Bindungsgrades bei variiertem Rezeptorkonzentration und konstantem Volumen verdeutlicht Abb. 5. Nach dem Zentrifugieren wurde der Bodensatz im Zentrifugenbecher mit Puffer so verdünnt, daß die Aufschwemmungen folgender Konzentrationen entstanden: 2,5, 5, 10, 20 ml/Hoden. Die Verdünnungen wurden aus der höchsten Rezeptorkonzentration abgeleitet, so daß keine individuellen Chargenunterschiede möglich waren. Die absolute Bindung, bei Verdünnung 2,5:1 49,2 %, geht auf 28,8 % bei Verdünnung 20:1

zurück, was einer Abnahme um 41,5 % entspricht. Bei der in den Routinetests verwendeten Verdünnung 10:1 liegt die Bindung noch bei 36,8 %, also um 25,5 % unter der in diesem Test erreichten Maximalbindung. Die bei der Verdünnung 2,5:1 erhaltene Rezeptoraufschwemmung verdient diesen Namen allerdings zu Unrecht, weil es sich eher um einen ziemlich dicken Brei als um eine "Aufschwemmung" handelt, der bei der Weiterverarbeitung einige Mühe bereitet.

Dieselben Verdünnungen bei der GZM ergeben einen wesentlich steileren Kurvenverlauf (4,0 %; 2,3 %; 1,5 %; 0,6 %). Vergleicht man die relative Bindung der beiden Methoden, d.h. setzt man den Maximalwert in beiden Methoden bei 2,5 ml Puffer/Hoden gleich 100 %, wäre nach der GZM bei 3,8:1 ungefähr dieselbe relative Bindung erreicht, wie bei 10:1 nach der Homogenatmethode, wozu man aber 2,6 mal soviel Ratten benötigen würde.

Die zweite Kurve der Abb. 5 zeigt, wie die Bindung abnimmt, wenn die zugesetzte Rezeptormenge dieselbe wie oben bleibt, das Inkubationsvolumen aber durch Pufferzusatz um 1 ml vermehrt wird (1,62:0,62 ml). Sie liegt zwischen 14,0 % bei der Verdünnung 2,5:1 und 17,5 % bei 5:1 und 10:1 niedriger als im vorangegangenen Versuch. Bei Verdopplung der Rezeptorkonzentration ließe sich der durch die Volumenvermehrung verursachte Bindungsschwund ausgleichen; die Vergleichsvolumina sind aber willkürlich gewählt, 1,62 ml sind das 2,6fache von 0,62 ml, nicht das Doppelte.

2.2.2.4. Variation des Rezeptorsuspensionsvolumens bei gleichbleibender Rezeptorkonzentration

In Abb. 6 ist zu sehen, wie sich die Bindung bei Variation des Suspensionsvolumens verhält. Es wird das Rezeptorangebot variiert, aber nicht durch Manipulation mit der Konzentration, wie in 2.2.2.3.; die Konzentration bleibt während des ganzen Tests 10 ml Puffer/Hoden. Die Bindung

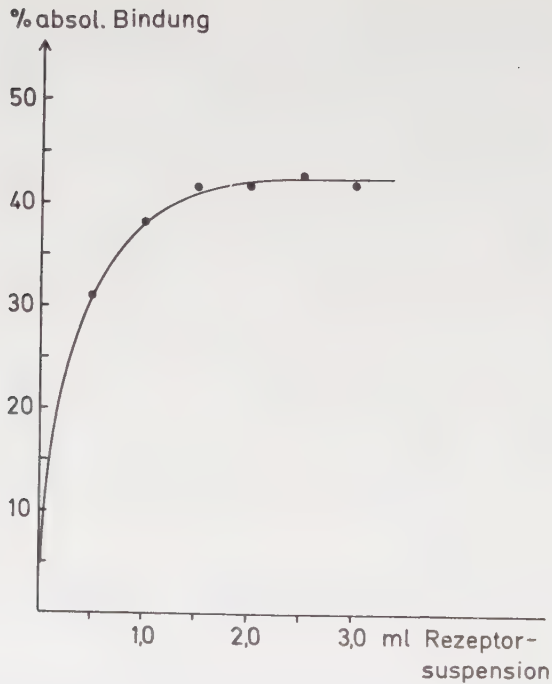


Abb. 6: Bindung von ^{125}J -HCG an den Rezeptor im Rattenhodenhomogenat bei verschiedenen Suspensionsvolumina und konstanter Rezeptorkonzentration (10 ml Puffer pro Hoden)

erreicht hier etwa bei 2,5 ml Suspension (2,62 ml Gesamtkubationsvolumen) ein Plateau und ist durch höhere Suspensionsmengen nicht zu steigern. Die in der Routine verwendeten 0,5 ml stehen hinter der bei 2,5 ml erreichten Bindung um 28,6 % zurück.

2.2.3. Kreuzreaktionen

2.2.3.1. TSH, PRL, GH, FSH¹

In Abb. 7 sind die Kreuzreaktionen der LH-Rezeptoren im Rattenhoden mit den übrigen Hormonen des HVL (TSH, PRL, GH, FSH) dargestellt. Die Standardkurve für LH (NIH-LH-B₈) zeigt den zwischen 30 und 1000 ng gewohnten Verlauf. Die anderen HVL-Hormone sind in Konzentrationen von 30 bis 50000 ng getestet. Mit Ausnahme von TSH gelingt es ihnen im Bereich der LH-Kurve nicht, das ¹²⁵J-HCG am Rezeptor zu ersetzen. Die TSH-Kurve sinkt bereits bei 500 ng und bei 50000 ng schließlich auf 32 % relative Bindung herunter, der niedrigste Wert nach GH. Von FSH wird die Bindung erst bei 5000, von PRL bei 10000 und von GH gar erst bei 20000 ng signifikant gedrückt. Während bei 50000 ng FSH aber die Bindung auf 73 % und bei PRL auf 79 % zurückgeht, sinkt sie bei GH auf 19 %, wie bei 1000 ng LH.

Dieselbe Reihenfolge in der LH-Aktivität dieser Hormone zeigte auch die Untersuchung nach der GZM.

2.2.3.2. LH-Analoga HCG und PMSG

Die Kreuzreaktionen der LH-Rezeptoren mit den LH-Analogen HCG und PMSG zeigt Abb. 8. Auf der Abszisse sind die Mengen des verwendeten Hormons für LH in ng, für HCG und PMSG in internationalen Millieinheiten (mIE) aufgetragen. Für die LH-Kurve wurde die NIH-Präparation B₈, für HCG wurden eine hochgereinigte Präparation mit der Biopotenz 13000 IE/mg (2nd IS HCG) der Fa. Serono (Rom, Italien) und eine mit 1000 IE/mg (Primogonyl) von Schering (Berlin) verwendet, für PMSG eine Präparation mit 10500 IE/mg und eine Präparation von Schering mit 1000 IE/mg (Anteron). Der Kurvenverlauf zeigt eine reguläre Reaktion des Rezeptors mit HCG. Beide Präparationen sind im Bereich bis 50 mIE/ng

¹) NIH-TSH-B₅, NIH-P-B₃, NIH-GH-B₁₅, NIH-FSH-S₆.

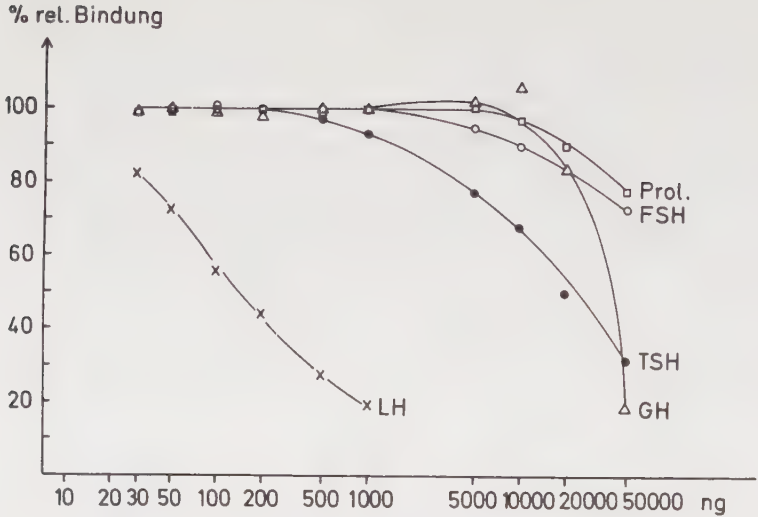


Abb. 7: Kreuzreaktionen des LH-Rezeptors im Rattenhoden mit Prolaktin (NIH-P-B3), FSH (NIH-FSH-S6), TSH (NIH-TSH-B5) und GH (NIH-GH-B15); Kontrollkurve mit LH (NIH-LH-B8) (absol. Bindung: 27,7 %)

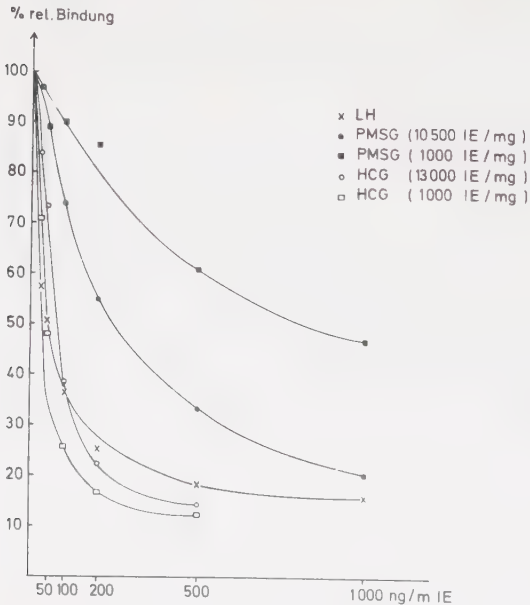


Abb. 8: Bindungsvergleich der LH-Analoga HCG und PMSG mit LH (NIH-LH-B8) (absol. Bindung: 20,8 %)

Organ	% rel. Bindung bei						
	0	30	50	100	200	500	1000 ng LH (NIH-LH-B ₈)
Hoden (Stier)	9,8	11,9	12,2	10,3	8,2	9,6	8,5
Samenleiterampulle	11,8			11,2			15,4
Samenblasendrüse	10,5	9,4	14,9	13,8	13,5	15,3	12,1
Prostata	15,3	20,8	18,7	19,0	18,0	21,4	22,8
Hypophyse	26,5	25,6	28,2	20,0	20,9	22,1	22,8
Leber	12,6	14,3	14,0	18,6	13,6	15,9	15,1
Niere	12,0	12,4	12,8	12,8	12,0	12,8	13,6
Muskelgewebe	48,8		60,1	57,7	51,6	52,2	63,5
Ovar ohne Gelbkörper	4,6	5,0	5,7	5,3	4,2	5,0	4,6
Endometrium	5,6		5,0	4,7	5,5	4,9	4,8

Tab. 2: LH/¹²⁵J-HCG-Bindung an das Homogenat verschiedener Organe des Rindes

geringer aktiv als LH, während sie danach - die Seronopräparation erst nach 100 mIE - aktiver als die Präparation des Luteinisierungshormons reagieren. Weiter beweist der Versuch die LH-Aktivität von PMSG, wenngleich es auch wesentlich inaktiver als LH und HCG ist.

Die Standardkurve für HCG hat bei Verwendung der LZS denselben Verlauf wie bei Verwendung des HHs.

2.2.4. Organspezifität

Neben dem Hoden der Ratte wurden folgende Organe des Rindes getestet: Leber, Niere, Muskel, Hypophyse, Hoden, Samenleiterampulle, Samenblasendrüse, Prostata, Eierstock mit Follikel (ohne Gelbkörper), Gelbkörper (isoliert) und Endometrium. Eine spezifische Gonadotropinbindung war außer im Kontrollorgan Rattenhoden nur im Gelbkörper der Kuh nachzuweisen. Die beiden Standardkurven zeigt Abb. 9. Der Gelbkörper reagiert weniger empfindlich als der Ratten-

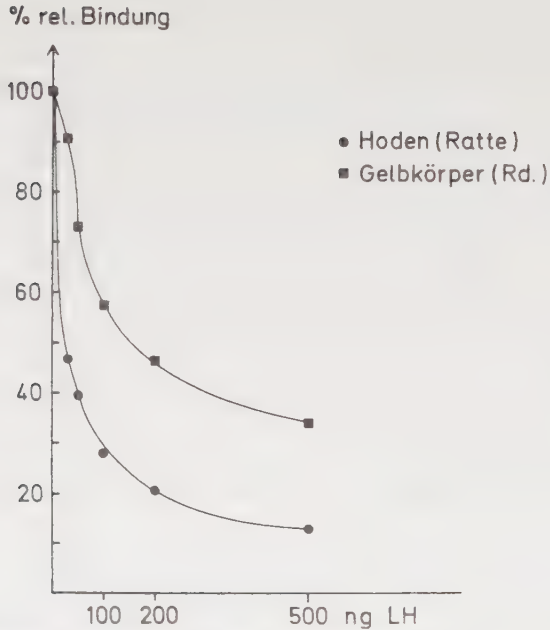


Abb. 9: Standardkurven für LH (NIH-LH-B8) mit Hoden- (Ratte; Konzentration: 10 ml Puffer/2 g; absol. Bindung: 27,5 %) und Gelbkörperhomogenat (Kuh; Konzentration: 5 ml Puffer/2 g; absol. Bindung: 17,4 %)

hoden.

Bei allen anderen Organen, auch beim Hoden des Stieres, blieb eine spezifische Bindung aus, d.h. das zugesetzte Standardhormon (zwischen 30 und 1000 ng) vermochte nicht, seiner Menge entsprechend, die Bindung des markierten HCGs zu reduzieren. Sie bewegte sich zwischen Blindwert und 1000 ng LH auf einem, je nach Organ unterschiedlich hohen Plateau, am höchsten bei Muskelgewebe, am niedrigsten bei Endometrium und Ovar (Tab. 2). Um der Vermutung zuvorzukommen, daß die Homogenatkonzentration des Stierhodens eventuell zu niedrig gewesen war, um das Hormon überhaupt spezifisch erfassen zu können, wurde ein weiterer Versuch mit variierten Konzentrationen angestellt: 1 ml Puffer:2 g

Rezeptor- konzentration (ml Puffer/g Gewebe)	% rel. Bindung bei				
	0	30	50	100	200
1 ml/2 g	142,3	138,9	158,5	137,0	146,2
2 ml/2 g	46,3	54,4	49,7	42,3	49,0
5 ml/2 g	20,2	16,1	16,8	14,1	14,1
10 ml/2 g	8,0	8,0	8,7	8,0	8,0
20 ml/2 g	6,0	4,7	6,0	5,3	5,3

Tab. 3: LH/¹²⁵J-HCG-Bindung an das Hodenhomogenat vom Stier bei verschiedener Konzentration

Gewebe, 2:2, 5:2, 10:2 und 20:2. Das Resultat zeigt Tab. 3. Die Bindung hielt sich bei jeder Konzentration auf einem gewissen Plateau, ohne auf den Standard zu reagieren, blieb also wieder unspezifisch. In Tab. 3 ist die relative Bindung angegeben, bezogen auf den Blindwert der mitlaufenden Kontrollkurve mit Rattenhoden. Die abnehmende Konzentration des Stier-HHs läßt die Bindung von 144,6 % bei 1:2 auf 5,4 % bei 20:2 sinken.

2.2.5. Artspezifität

Der LH-Rezeptor reagiert auch in vitro nicht artspezifisch, was sich in folgenden Versuchsergebnissen ausdrückt: 1. Als markiertes Hormon wird ¹²⁵J-HCG, ein vom Menschen stammendes LH-Analog, spezifisch gebunden; kaltes HCG verdrängt es in dosisabhängigem Ausmaß vom Rezeptor (s. 2.2.3.2.). 2. Derselbe Rezeptor bindet auch das vom Pferd stammende PMSG spezifisch (s. 2.2.3.2.). 3. Besonders angestellte Vergleiche zwischen Rinder-, Schaf- und Human-LH ergeben einen parallelen Kurvenverlauf (Abb. 10). Die Aktivitäten der einzelnen Präparationen unterscheiden sich freilich. So verläuft die Kurve der hLH-Präparation (biol. Aktivität im OA-Test: 3,7xNIH-LH-S₁) am steilsten

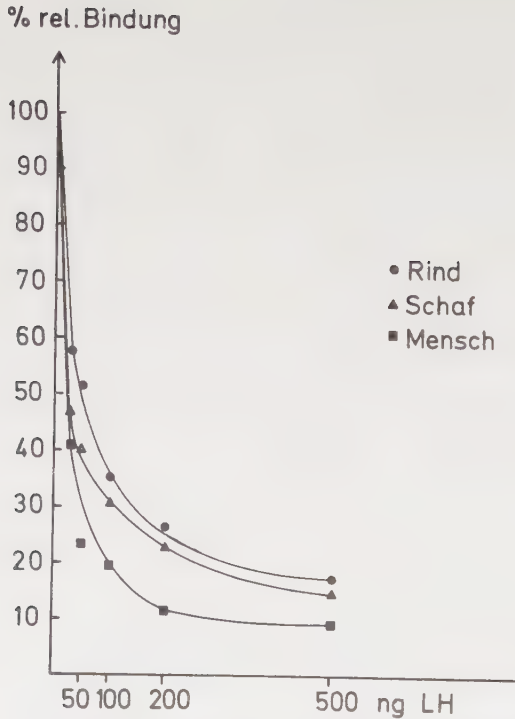


Abb. 10: Standardkurven für bovines ($1,03 \times \text{NIH-LH-S}_1$), ovi-
nes (ca. $2 \times \text{NIH-LH-S}_1$) und hLH ($3,7 \times \text{NIH-LH-S}_1$)
(absol. Bindung: 30,6 %)

(50 %-Intercept: 20 ng), die Kurve der Papkoff-Präparation vom Schaf (ca. $2 \times \text{NIH-LH-S}_1$) weniger steil (23 ng) und schließlich die Kurve für Rinder-LH (NIH-LH-B_8 ; $1,03 \times \text{NIH-LH-S}_1$) am flachsten (41 ng).

Präparationen	Aktivität in Einheiten NIH-LH-S ₁			ID	
	RT	OA-Test	RIT	RT OA-Test	RT RIT
LER-1	1,27	1,09	1,09	1,16	1,16
LER-2	1,33	1,02	1,14	1,30	1,16
Papkoff III 278-P	1,08	0,81		1,91	
NIH-LH-B ₃	1,04	0,99	1,43	1,34	0,73
NIH-LH-B ₅	1,06	0,61	0,53	1,25	2,20
NIH-LH-B ₆	1,16	0,85	0,63	1,05	1,68

Tab. 4: Potenzvergleich verschiedener LH-Präparationen vom Rind, nach Testmethoden geordnet;
Diskriminationsindices in den letzten beiden Spalten

2.2.6. Potenzvergleich verschiedener LH-Präparationen vom Rind und Vergleich der Ergebnisse mit denen aus dem OA- und RIT

Bezugspunkt für den Potenzvergleich der LH-Präparationen vom Rind: NIH-LH-B₃, -B₅, -B₆, -B₈, LER¹-1, LER¹-2 und Papkoff III 278-P² ist NIH-LH-S₁. Über NIH-LH-B₈, das im OA-Test die 1,03fache Aktivität von NIH-LH-S₁ zeigt, wurden die Aktivitäten der anderen LH-Präparationen in -S₁ umgerechnet.

Die Präparationen wurden in zwei voneinander getrennten, aber vollkommen gleich angeordneten Tests miteinander verglichen. Aus jedem Test wurden die Bindungen der jeweils dreifach angesetzten Proben bei 50, 100, 200 und 500 ng herangezogen.

In Tab. 4 sind die Aktivitäten der Präparationen nach Testmethoden getrennt (RT, OA-Test, RIT) aufgeführt. Zu-

-
- ¹) Hochgereinigte LH-Präparationen von Dr. Reichert, Atlanta, Ga., USA.
 - ²) Hochgereinigte LH-Präparation von Dr. Papkoff, S. Francisco, Calif., USA.

letzt sind noch die Diskriminationsindices (ID) RT:OA-Test und RT:RIT angegeben.

An vorderer Stelle in allen Testsystemen liegen die beiden LER-Präparationen, die nur im RIT noch von NIH-LH-B₃ übertroffen werden. Im übrigen offenbart sich die Reihenfolge der Aktivitäten in den verschiedenen Systemen als sehr unterschiedlich, wie die Tabelle zeigt. Als Grundtendenz kann man jedoch an Hand der IDs RT:OA-Test und RT:RIT feststellen, daß die im RT gemessene Aktivität der Präparationen durchschnittlich 1,33 mal so hoch ist, wie die im OA-Test, und durchschnittlich 1,38 mal so hoch, wie die im RIT ermittelte.

2.2.7. Anwendung der RT-Methode für die LH-Bestimmung im Rinderserum

2.2.7.1. LH-Wiederfindung im Rinderserum

Zu diesem Versuch wurden zwei Standardreihen inkubiert, je eine zur Kontrolle mit 1 ml Puffer als Volumenausgleich und mit 1 ml Rinderserum (aus Schlachtblut) Zusatz zur Probe. Die verwendeten Rezeptorsuspensionen waren für beide Reihen identisch. Das Resultat des Tests ist in Abb. 11 festgehalten. Die Kurve mit Pufferzusatz zeigt den gewohnten Verlauf einer LH-Standardkurve, die andere, mit Serumzusatz, differiert hingegen sehr weit von ihr; zumindest im wichtigen Anfangsteil bis etwa 200 ng ist die Beeinträchtigung der Bindung durch das Serum beträchtlich. miteinander verglichen sehen die Werte bis 200 ng im einzelnen folgendermaßen aus: Der Blindwert der Serumkurve liegt mit 50,5 % relativer Bindung um 49,5 % unter dem Blindwert der Pufferkurve (100,0 %). Von 30 ng finden sich noch 17 ng (-43,3 %), von 50 ng 32 (-26 %), von 100 ng noch 79 (-21 %) und von 200 ng schließlich noch 194 ng (-3 %). Ähnlich verläuft die Wiederfindung bei Verwendung der LZS.

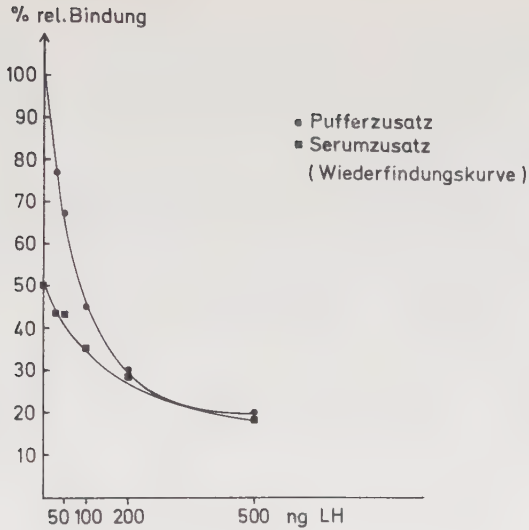


Abb. 11: Wiederfindung von LH (NIH-LH-B8) im Rinderserum: Standardkurven für LH bei je 1 ml Puffer- oder Serumzusatz zum Inkubat (absol. Bindung: 20,3 %)

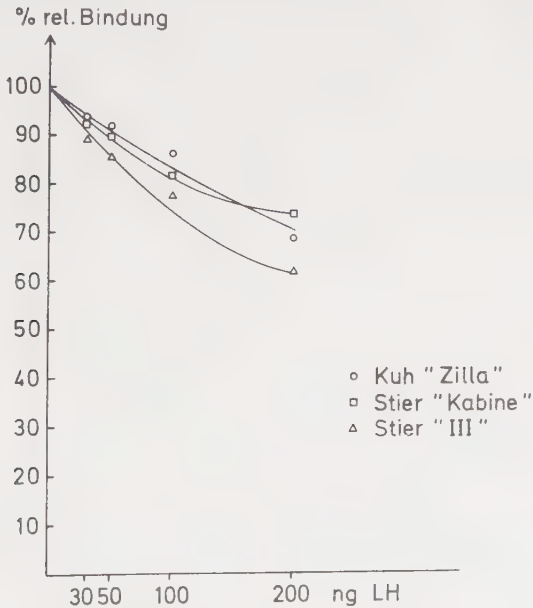


Abb. 12: Standardkurven für LH (NIH-LH-B8) bei Zusatz von Serum verschiedener Tiere zum Inkubat (absol. Bindung: 5,2 %)

Nun liegt natürlich der Schluß nahe, daß man, um das Bindungsmanko zu kompensieren, die Standardkurve zur Absteckung des Meßbereichs mit Serumzusatz anlegt. Der Fehler durch das Bindungsminus müßte damit ausgeglichen sein. Die Untersuchung dieser Möglichkeit zeitigte aber als Ergebnis, daß verschiedene Rinderseren verschieden stark die Bindung reduzieren (Abb. 12). Der Blindwert war bei allen verwendeten Seren gleich (absolute Bindung: 5,2 %), doch divergieren dann die Kurven, ohne ein System erkennen zu lassen. Wenn man aber eine der Kurven als Standardkurve wählt, um die Blindwertergebnisse der anderen als zu untersuchendes Serum zu nehmen, ist in allen der LH-Spiegel zu niedrig, um in den Meßbereich zu kommen. Die Empfindlichkeit der Kurve ist, wie die Abbildung zeigt, sehr gering.

Der hohe negative Einfluß des Serumfaktors auf die Bindung war nun Anlaß zu weiteren Untersuchungen dieses Phänomens.

2.2.7.2. Serumzusatz in verschiedener Verdünnung

Es werden hier nur Blindwerte miteinander verglichen. Das Inkubationsvolumen setzt sich zusammen aus: 0,5 ml Rezeptorsuspension, 0,1 ml ^{125}J -HCG, 1,0 ml Rinderserum oder -verdünnung und 0,02 ml Trasylol. Die Verdünnungsreihe des Rinderserums ging von unverdünnt über 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:9, 1:19, 1:49, 1:69 und 1:99 zu reinem Puffer. In Abb. 13, die das Versuchsergebnis wiedergibt, ist auf der Abszisse der Serumanteil im Zusatzmilliliter prozentual aufgetragen (reiner Puffer 0 %, reines Serum 100 %). Nach etwas holperigem Kurvenverlauf bei den höheren Serumverdünnungen nimmt schließlich ab Verdünnung 1:3 bis zum unverdünnten Serumzusatz die Bindung sehr schön kontinuierlich ab. Deutlich wird die Reduzierung zum ersten Mal, wenn auch noch geringgradig, bei 1:69 mit 0,5 % (99,5 % relative Bindung). Bei 1:19 sind es dann schon

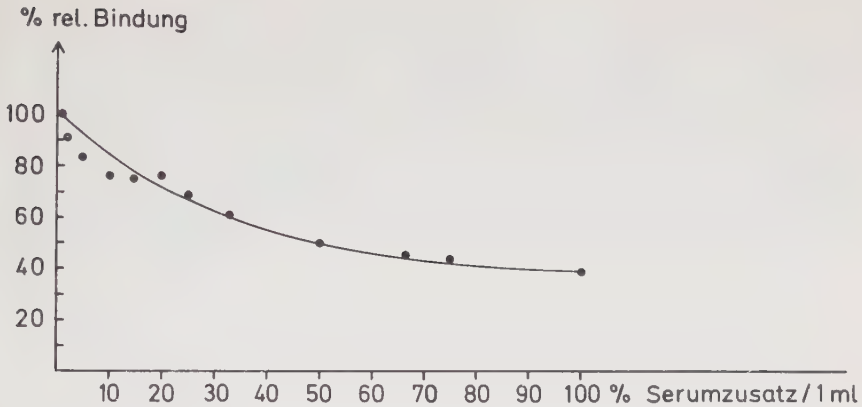


Abb. 13: Einfluß verschiedener Serumkonzentrationen auf die ^{125}J -HCG-Bindung an den Rezeptor des Rattenhodenhomogenats (absol. Bindung: 28,2 %)

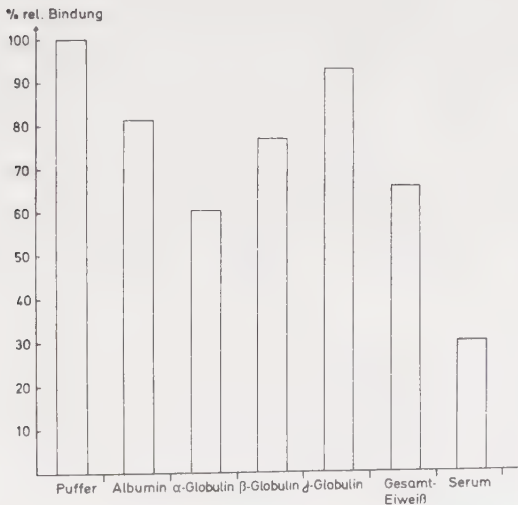


Abb. 14: Bindung von ^{125}J -HCG an den Rezeptor des Rattenhodenhomogenats in Abhängigkeit von verschiedenen Serumweißfraktionen des Rindes im Inkubat; die Säulen für Puffer- und Serumzusatz geben die Kontrollwerte an (absol. Bindung: 9,8 %)

8,9 %, bei 1:9 26 % Bindungsminderung. Beim Serumanteil 100 %, also unverdünnt, beträgt schließlich der Verlust 63,1 %, noch gut 10 % mehr als im vorher beschriebenen Wiederfindungsversuch. In vier verschiedenen Tests waren es 45,9, 62,5, 61,2 und 69,5 % (immer dasselbe Serum), wobei die ersten beiden Werte auch zur selben Markierung gehören.

2.2.7.3. Einfluß der einzelnen Serumeiweißfraktionen auf die Bindung (Albumin, Alpha-, Beta-, Gammaglobulin)

Ziel dieses Versuches war es, die Eiweißkomponenten in den Griff zu bekommen, die in erster Linie für die Bindungssenkung bei Serumzusatz verantwortlich sind. Den Proben wurde anstatt 1 ml Rinderserum, wie in den vorausgegangenen Versuchen, je 1 ml Lösung der verschiedenen Serumeiweißfraktionen zugegeben. Das Eiweiß war in Puffer in physiologischer Konzentration gelöst: Albumin 2,95 g; Alpha-globulin 0,94 g; Betaglobulin 0,74 g; Gammaglobulin 2,08 g; Gesamteiweiß 6,71 g. Die Gewichtsangaben beziehen sich auf 100 ml (nach Kolb, 1967).

Es wurden wieder Blindwerte miteinander verglichen. Zur Kontrolle liefen Proben mit Serum- und Pufferzusatz mit. Bezugspunkt für die Berechnung der relativen Bindung sind mit 100 % die Proben mit Pufferzusatz. Abb. 14 zeigt die Auswirkung der verschiedenen Proteinfaktoren auf die Bindung.

Die stärkste Verminderung verursachte Alphaglobulin mit -39,5 %, die geringste Gammaglobulin mit 6,6 %. Das Gammaglobulin mit 31 % Anteil am Gesamteiweiß (hinter Albumin mit 44 % an zweiter Stelle) senkt die Bindung am wenigsten, Alphaglobulin mit 14 % Mengenanteil (vor Betaglobulin mit 11 %) aber am massivsten. Die anteilmäßig stärkste und schwächste Fraktion liegen in geringem Abstand vonein-

ander im Mittelfeld. Die Probe mit dem Zusatz des Gesamteiweißes erreicht mit -33,7 % nicht den Bindungsverlust wie Alphaglobulin allein.

Alle hier gemessenen Werte liegen über dem durch die Zugabe unverdünnten Rinderserums verursachten Bindungsrückgang von 69,5 %, mehr als das Doppelte der Verminderung beim Gesamteiweißzusatz.

R e v e r e n z

Herrn Dr. Reichert und Herrn Dr. Papkoff, sowie den National Institutes of Health sei an dieser Stelle für die Überlassung der LH-Präparationen bestens gedankt.

5. Diskussion

Es erschien zweckmäßig, die GZM nicht beizubehalten und, der Empfehlung von Catt et al. (1972 a) folgend, die Homogenatmethode zur Rezeptorpräparation heranzuziehen, da die GZM drei gewichtige Nachteile birgt:

1. Sie führt zu geringer Bindung; nur bei Verwendung des optimalen, experimentell ermittelten Rezeptorvolumens 2,0 ml in der Konzentration 1,0 ml Puffer/Hoden und bei der optimalen, ebenfalls im Versuch ermittelten Inkubationszeit von 240' gelang eine absolute Bindung von wenigstens 6 %, die aber, wahrscheinlich entsprechend der Qualität des markierten HCGs, erheblichen Schwankungen unterlag, meistens in Richtung Bindungsverringerung.
2. Der Rezeptor läßt sich bei der GZM nur beschränkt standardisieren; denn auch bei größter Sorgfalt zerrupft man die Tubuli nie zweimal völlig gleich, stopft nie den Glaswollfilter ganz genau, wie beim vorangehenden Mal, und erreicht auch nicht wiederholt eine genau gleich dicke Tubulischicht auf der Glaswolle.
3. Infolge der benötigten relativ hohen Hodenzahl ist der materielle, wie auch der Zeit- und Arbeitsaufwand bei diesem Verfahren im Vergleich mit der Homogenatmethode beträchtlich.

Die Punkte 1. und 2. stellen vor allen Dingen auch nicht zu unterschätzende Ungenauigkeitsfaktoren dar. Bei der Homogenatmethode läßt sich eine ziemlich genaue Standardisierung erreichen, da Homogenisieren und Niederzentrifugieren der Zellbestandteile immer recht präzise wiederholbar sind. Die Ungenauigkeitsfaktoren: Rückstände im Glaswollfilter und in den Gefäßen, sowie Maschinenfehler wiegen demgegenüber gering. Die Bindungsergebnisse bei der GZM

decken sich mit denen Catts et al. (1971), die für die LZS 5 bis 12 % erzielte Bindung beschreiben (an anderer Stelle jedoch, 1972 a, 10 bis 40 %); allerdings ist der vorliegende Versuch nicht derselbe, wie bei Catt et al., da die Inkubationsbedingungen wesentlich verbessert wurden. Andernfalls müßten nämlich die Bindungswerte noch unter den in der Literatur beschriebenen liegen. Das Zentrifugieren des Filtrats bei 2000 g dürfte zwar bei Catt et al. zu einer erhöhten Leydigzellenausbeute geführt haben, die aber kaum die in unserem Versuch beschriebene höhere Rezeptorkonzentration wettmachen kann. Möglicherweise erklärt sich auch die mindere Bindung bei den eigenen Versuchen aus der Verwendung des Suspensionsmediums. Die LZS wurde in KHL aufgeschwemmt, der NaHCO_3 und MgCl_2 mangelten, woraus eine geringere Molarität resultiert, die hinwiederum der Bindung abträglich ist (Leidenberger et al., 1973). Eine zu hohe negative Beeinflussung der hormonalen Bindungsfähigkeit durch die Markierungsprozedur scheidet insofern als Ursache für die Unterschiede zwischen den Ergebnissen Catts et al. und den eigenen aus, als ja das HCG immer auf dieselbe, in "Material und Methode" (2.1.2.) beschriebene Art markiert wurde. Beim HH bewegt sich zudem die Bindungshöhe in gewöhnlichem Rahmen (Catt et al., 1972 a).

Daß nur HCG und nicht auch LH als markiertes Hormon zu verwenden war, dürfte auf Einflüsse zurückzuführen sein, die die Markierung auf die Hormonmoleküle ausübt. Das LH-Molekül verträgt den Markierungsvorgang offensichtlich wesentlich schlechter als das HCG-Molekül und büßt dabei seine Bindungsaktivität ein. Bei LH bedarf es, wie es scheint, gar nicht erst des von Leidenberger und Reichert Jr. (1972 a) beschriebenen Chloramin-T-Hormon-Verhältnisses 12:1 für 120"; es genügt zur Inaktivierung bereits 10:1 für ein Achtel der Zeit. Zur endgültigen Beurteilung

dieser Frage bedürfte es eines Versuches mit dem von Leidenberger und Reichert Jr. als am günstigsten befundenen Verhältnis 2:1 für 20". Die tadellose Verwendbarkeit des markierten LHs im RIT weist darauf hin, daß sich die biologischen Rezeptoren ihr Hormon nach anderen Gesichtspunkten aussuchen als die Antikörper, und bestätigt, daß der RIT wenig über die biologische Aktivität von LH aussagen kann.

Die Ergebnisse aus den Versuchen zur Klärung der Konservierbarkeit der Rezeptoren beweisen in erster Linie, daß der RT eine sehr bequeme Testmethode ist. Man darf aus dem Vergleich der Bindungen schließen, zumal aus dem ziemlich gleichmäßigen Abstand während fünf gegenüberstehender Versuche, daß der Rezeptor beim Einfrieren geschädigt wird, es aber bei dieser einmaligen Schädigung bleibt, die bei längerer, sachgemäßer Lagerung nicht oder fast nicht fortschreitet, jedenfalls nicht bei Lagerung über vier Monate hinweg. Wie der Interceptvergleich zeigt, ist die Schädigung zudem ausschließlich quantitativer Natur. Der Verlust der Bindungsfähigkeit bei einer gewissen Anzahl Rezeptoren ist offenbar vollständig, ebenso die bei den restlichen Rezeptoren erhalten gebliebene Bindungsfähigkeit, da die Empfindlichkeit nicht im mindesten angetastet wird. Nimmt man in Kauf, daß nur noch ca. 60 % der ursprünglichen Bindungskapazität ohne Qualitätsbeeinträchtigung des Rezeptors nach der Kältekonservierung zur Verfügung stehen, kann man bequem in einem Arbeitsgang den Rezeptorbedarf für mindestens vier Monate, wahrscheinlich aber für noch länger, decken.

Die Reproduzierbarkeit wird vornehmlich von zwei Faktoren bestimmt: Von den individuellen Unterschieden zwischen den Rezeptorspendern und vom markierten Hormon, dem dabei die Schlüsselrolle zufällt. Die individuellen Unterschiede wirken sich weit weniger aus als die Unterschiede bei der

Markierung, obwohl in jedem Fall gleich durchgeführt, wie unter "Material und Methode" (2.1.2.) beschrieben; hierbei ist ja zu berücksichtigen, daß die Jodchargen bei den einzelnen Markierungen auch verschiedener Qualität sind.

Die Abnahme der Bindung nach drastischer pH-Senkung begründet sich mit der unter pH 5,5 bereits einsetzenden Dissoziation des Hormon-Rezeptor-Komplexes. Eine pH-Abhängigkeit dieser Art ist allgemein auf die Wirkung zweier Gruppen oder Gruppenklassen mit verschiedenen pK-Werten zurückzuführen (Leidenberger et al., 1973).

Bemerkenswert sind die Auswirkungen unterschiedlicher Inkubationszeiten auf die Bindung bei der LZS und beim HH. Daß die Bindung bei Verwendung des HHs auch nach fünf Stunden noch kein Plateau erreicht, stimmt mit den Berichten Catts et al. (1972 b) überein, die bei 37°C Inkubationstemperatur erst nach zwölf Stunden eine Bindungsabnahme finden. Für die Bindungsverminderung machen sie eine Degradation des markierten Hormons während der Inkubation bei 37°C verantwortlich. Die Abnahme der Bindung an die LZS nach dreieinhalb Stunden könnte jedoch auch auf einen Abbau des Rezeptors schließen lassen, der sich bei den intakten Zellen möglicherweise schneller vollzieht als bei den Membranbruchstücken des Homogenats.

Betrachtet man den Einfluß der Rezeptorkonzentration auf die Bindung, fällt wiederum ein Unterschied zwischen LZS und HH auf: Mit dem HH arbeitet es sich selbst dann ökonomischer, wenn man sich mit der relativen Bindung zufriedengibt und die absolute Bindung außer acht läßt. Im übrigen ist es weiter nicht verwunderlich, daß die Bindung bei erhöhter Rezeptorkonzentration zunimmt, weil ja dadurch das Rezeptorangebot vergrößert wird, also mehr zugesetztes Hormon gebunden werden kann. Man könnte jedoch erwarten, daß beispielsweise bei doppelter Verdünnung (2,5:1;

5:1) die Bindung nur noch die Hälfte der ursprünglichen betrüge und bei vierfacher Verdünnung nur noch ein Viertel, was aber nicht der Fall ist. Die Ursache dafür dürfte das Prinzip der Sättigungsreaktion sein, denn um eine solche handelt es sich hier. Die abnehmende Rezeptorkonzentration bei gleichbleibender ^{125}J -Hormondosierung könnte man auch als zunehmende Hormonkonzentration bei gleichbleibendem Rezeptorangebot auffassen. Da sich aber tatsächlich das Verhältnis der Rezeptorenzahl zur ^{125}J -HCG-Menge zugunsten des markierten Hormons ändert, wird eine relativ immer größere Zahl der in den 0,5 ml Suspension enthaltenen Rezeptoren abgesättigt.

Vergrößert man das Inkubationsvolumen und läßt dennoch die Anzahl der Rezeptoren gleich, vermindert sich die Bindung zwangsläufig, da es durch die größere räumliche Ausdehnung für ein Hormonmolekül schwieriger wird, einen Rezeptor zu finden. Wollte man den RT zur LH-Messung im Serum verwenden, müßte man der Volumenerweiterung auch im Standardansatz Rechnung tragen.

Die in "Material und Methode" (2.1.) beschriebenen Testbedingungen wurden trotz der verschiedenen Möglichkeiten, die Bindung zu erhöhen, eingehalten, da sie einen vernünftigen Kompromiß aus Aufwand und Erfolg darstellen. Im Gegenteil, es steht zu fragen, ob nicht, ohne die Qualität des Testsystems wesentlich zu beeinträchtigen, bei der Rezeptorkonzentration oder der Inkubationszeit der Wirtschaftlichkeit oder der Bequemlichkeit noch Zugeständnisse gemacht werden können.

Ein unterschiedlich starkes Reagieren der LH-Rezeptoren des Rattenhodens mit TSH, GH und FSH (nicht PRL) wird überall berichtet, wo Versuche dieser Art angestellt wurden (Catt et al., 1971; Catt et al., 1972 a; Leidenberger und Reichert Jr., 1972 a; Leidenberger und Reichert Jr.,

1972 b). Zwar wurde in keinem Fall eine der hier verwendeten Präparationen getestet, doch liegen hier wie dort die Ursachen der Kreuzreaktionen in einer Verunreinigung der Präparationen mit LH. Die hohen, bei weitem das physiologische Maß übertreffenden Dosierungen schließen eine echte LH-Aktivität, eine eigentliche Bindung dieser HVL-Hormone an die Rezeptoren also, aus. Die LH-Aktivität der HCG-Präparationen war nach allen Angaben (Catt et al., 1971; Catt et al., 1972 a; Leidenberger und Reichert Jr., 1972 a) und vor allem in Anbetracht der Tatsache, daß zwischen LH und HCG eine partielle Identität besteht (Goss und Lewis, 1964; Shahani und Rao, 1964), nicht anders zu erwarten. Daß PMSG neben seiner FSH-Aktivität auch LH-Aktivität besitzt (OA-Test; Adam, 1964), wurde nun auch mit dem RT bestätigt.

Neben den Leydigzellen des Rattenhodens sind als Träger spezifischer LH-Rezeptoren auch der Gelbkörper (Catt et al., 1972 a; Lee und Ryan, 1971; Leyendecker et al., 1973; Rajaniemi und Vanha-Perttula, 1972) und die Thekazellen des Follikels (Rajaniemi und Vanha-Perttula, 1972) der Ratte, sowie die Granulosazellen des Schweineovars (Kammerman et al., 1972) ausgewiesen, nicht aber Leber, Niere (Leidenberger und Reichert Jr., 1972 a; Rajaniemi und Vanha-Perttula, 1972) und Herzmuskulatur (Leidenberger und Reichert Jr., 1972 a) der Ratte. Diese bekannten Tatsachen begründeten gewisse Erwartungen an die Untersuchung von inneren Organen des Rindes auf spezifische LH-Bindung. Der Unterschied zwischen der LH-Bindung an den Gelbkörper einer Kuh und den Rattenhoden deutet auf eine verschieden hohe Rezeptorkonzentration in beiden Organen hin. Analoges geht aus dem Vergleich der LH-Bindung an Rattenhoden und Ovar der pseudograviden Ratte hervor (Catt et al., 1972 a). Wenn aber LH an den Gelbkörper einer beliebigen Kuh spezifisch gebunden wird, fragt man sich, warum nicht an den

Stierhoden. Um die Rezeptoren im Stierhoden nachzuweisen, bedarf es aber offenbar anderer (Präparations-) Methoden als der praktizierten und beim Rattenmännchen erfolgreichen. Da die spezifische Bindung an das Stier-HH ausbleibt, ist es zudem nicht gestattet zu sagen, daß in den mitgetesteten anderen Organen des Rindes keine spezifischen LH-Rezeptoren vorhanden seien. Es wird noch weiterer Untersuchungen bedürfen, um diese Frage endgültig zu klären.

Wertet man die Ergebnisse der vorliegenden Testreihen mit Blickrichtung auf die Artspezifität der Rezeptoren aus, erhält man nur eine weitere Bestätigung der alten Annahme, daß der Hormonrezeptor nur die biologische Aktivität erfaßt und aus diesem Grunde nicht artspezifisch reagiert.

Der Potenzvergleich verschiedener Hormonpräparationen kann naturgemäß immer nur innerhalb eines Testsystems durchgeführt werden, da in den verschiedenen Testsystemen jeweils verschiedene Hormoneigenschaften bestimmt werden. Besonders streng trifft dies zu, wenn man die Aktivitäten im Biotest mit denen im RIT vergleicht. Im RIT wird die immunologische Aktivität eines Hormons gemessen, im Biotest die biologische. Auch in den beiden Biotests - der RT ist ja nichts anderes als ein In-vitro-Biotest - werden verschiedene Eigenschaften des Hormons bestimmt: Im RT die Aktivität, beschränkt auf den unmittelbaren biologischen Aufgabenbereich an der Zellmembran, im Biotest in vivo die Aktivität, wie sie sich offenbart, wenn das Hormon auch dem gesamten Metabolismus im Organismus unterliegt. Dies ist die natürliche Ursache dafür, daß die Diskriminationsindices für die einzelnen Präparationen von System zu System schwanken können, wie es auch anderwärts angenommen wird (Leidenberger und Reichert Jr., 1972 b). Das entsprechende Testsystem ist je nach den Eigenschaften auszusuchen, die unter den Präparationen verglichen werden sollen. Jedes Verfahren stellt nur eine Annäherung an die Idealme-

thode dar. Wenn man die oben genannten interpretativen Vorbehalte berücksichtigt, kann aber der RT bei Verwendung des hHs zur Messung nicht nur der hLH-Aktivität in Hypophysenfraktionen, wie Leidenberger und Reichert Jr. beschreiben, sondern auch zur Messung der LH-Aktivitäten in den Hypophysenpräparationen anderer Spezies dienen.

Eine weitere praktische Anwendbarkeit des LH-RTs, vor allem für die wünschenswerte LH-Bestimmung im Rinderserum oder -plasma, wird durch die Einwirkung des Serums auf die Bindung und die relativ geringe Empfindlichkeit des Systems für das bovine LH beschränkt.

Der Mechanismus der Bindungsminderung bei Serumzusatz im Medium ist zweifach erklärbar. Entweder werden an die Rezeptoren neben dem Hormon in hoher Menge andere Eiweißkörper des Serums gebunden, so daß die Rezeptoren bereits besetzt sind, wenn das Hormon mit der Bindung an der Reihe wäre, oder der Wettbewerb um die Rezeptorstelle nicht nur zwischen markiertem und nicht markiertem Hormon, sondern zwischen den beiden Hormonen und den Eiweißkörpern ausgetragen wird. Erst in höherer Dosierung wäre das Hormon stark genug, die Serumeiweißkörper zu verdrängen. Das würde aber bedeuten, daß auch beliebiges Eiweiß von den LH-Rezeptoren spezifisch gebunden wird und stünde im Widerspruch dazu, daß nicht einmal mehr biologisch inaktiv gewordenes oder bei der Markierung geschädigtes, aber immunologisch noch aktives Hormon (s. 2.2.1.1.) gebunden wird. Auch ^{131}J -markiertes bovines Serumalbumin wird nicht spezifisch gebunden (Leidenberger und Reichert Jr., 1972 a). Die andere, wahrscheinlichere Möglichkeit ist deswegen die, daß das Hormon, kalt und markiert, an Serumeiweißpartikel adsorbiert wird, deswegen, vom Rezeptor nicht mehr "erkannt", in Lösung bleibt und bei der Trennung des gebundenen vom freien Hormon nicht abzentrifugiert, sondern mit dem Lösungsmittel weggekippt wird. Die Bindung wird

vermindert, weil dem Rezeptor für ihn bestimmtes Hormon vorenthalten bleibt. Shiu et al. (1973) berichten über den PRL-RT, daß den Standardproben zum Ausgleich der auch von ihnen festgestellten Bindungs- und Empfindlichkeitsminderung dieselbe Serummenge, wie den Testproben zuzugeben ist, Serum jedoch von hypophysektomierten Individuen, die entweder derselben Spezies wie die Spender des Testserums angehören, oder generell von hypophysektomierten Ratten. Die Hypophysektomie der Lieferanten des Korrekturserums ist für die PRL-Messung auch zweifellos notwendig, da bereits der PRL-Basissspiegel wesentlich höher liegt als der LH-Basissspiegel und auch bei den verschiedenartigsten Anlässen enormen Schwankungen unterliegt (Schams, 1972). Kann man sich zur LH-Messung beim Rind wegen des ohnehin niedrigen LH-Basissspiegels im Blut die - technisch bisher auch noch nicht mögliche - Hypophysektomie sparen, bleibt, wie die Versuchsergebnisse beweisen, dennoch die Kompensierung der serumbedingten Bindungsminderung durch Serumzugabe zum Standard wegen der verschiedenen hohen Adsorptionskapazität verschiedener Rinderseren problematisch. Für eine einigermaßen zuverlässige Messung bedürfte es wenigstens eines konstanten Fehlers. Der Versuch, die adsorptiven Faktoren durch Testung der Einzelfraktionen des Serum-eiweißes reproduzierbar in den Griff zu bekommen, bleibt fragwürdig. Das Interesse an der verantwortlichen Fraktion kann nur theoretisch sein, denn wie sollte man ohne großen Aufwand diese Fraktion dann aus dem Serum entfernen? Offensichtlich sind auch noch sämtliche Fraktionen an der Adsorption beteiligt, wobei nicht zu erklären ist, warum bei Vereinigung aller Serumeiweißfraktionen weniger Hormon adsorbiert wird als von Alphaglobulin allein. Das Originalserum muß darüberhinaus noch über weitere adsorptiv tätige Faktoren verfügen, die einem künstlich angerührten Serum nur schwer mitzuteilen sind und sich aus dem echten

Serum kaum extrahieren lassen.

Der Meßbereich für das bovine LH ist nicht so empfindlich, wie der für Schaf- und Human-LH und HCG beschriebene (Catt et al., 1972 a) und für LH-Messungen im Rinderserum bereits problematisch, wenn man in Rechnung stellt, daß physiologische LH-Peaks beim Rind bis etwa 30 ng/ml steigen und nur bei Verabreichung von höheren Dosen des LH-Releasing-Hormons (1500 µg i.m.) 70 bis 100 ng/ml erreichen können (Höfer, 1973).

Die durch die bei Serumzusatz niedrige Bindung bedingte Ungenauigkeit, die relativ geringe Empfindlichkeit des Systems, die verschieden hohe Hormonadsorption in den Seren verschiedener Tiere und der vergleichsweise niedrige LH-Spiegel im Rinderserum, dies alles spricht gegen den RT in der vorliegenden Form zur LH-Messung im Rinderserum. Vielmehr kann nur die Feststellung von Leidenberger und Reichert Jr. (1972 b) bekräftigt werden, daß die Bedeutung dieses Testsystems in der Möglichkeit des Potenzvergleichs verschiedener Hypophysen- und LH-Präparationen liegt. Dabei bestimmt ausschließlich die wirkliche biologische Aktivität und kein metabolistischer oder immunologischer Faktor das Ergebnis.

4. Zusammenfassung

In der Arbeit wurde versucht, einen Rezeptortest als dritten grundsätzlichen Weg für die LH-Bestimmung im Rinderblut aufzubauen, nachdem die herkömmlichen Meßprinzipien des Biotests in vivo bzw. Radioimmunotests jeweils bestimmte Aussagegrenzen aufweisen.

Sowohl Hodenhomogenat als auch die Suspension ganzer Leydigzellen wurden untersucht. Das Homogenat des Rattenhodens ist zur Verwendung als LH-bindende Rezeptorfraction besser als die Leydigzellensuspension geeignet. Der Meßbereich dieses Systems liegt etwa zwischen 20 und 500 ng LH (NIH-LH-B₆). Die Bindung kann gesteigert werden durch Erhöhung der Rezeptorkonzentration, durch Vermehrung des Rezeptorsuspensionsvolumens bis 2,5 ml und durch Verlängerung der Inkubationszeit. Sie wird gesenkt durch Erniedrigung des pH-Wertes (im Versuch pH 7,5 und 3,95), Erhöhung des Inkubationsvolumens ohne Erhöhung der Rezeptormenge und durch Zugabe von Serum zum Inkubationsmedium. Serum verschiedener Tiere senkt die Bindung in verschieden hohem Ausmaß. Der Nachweis wird erbracht, daß immunologische Aktivität kein Maßstab für biologische Aktivität ist. HCG verträgt die Markierung besser als LH.

Die Reproduzierbarkeit wird in erster Linie von der Qualität des markierten Hormons, in zweiter Linie durch individuelle Unterschiede zwischen den Rezeptorspendern beeinflusst.

Das aufbereitete Hodenhomogenat kann tiefgefroren (-24°C) mindestens vier Monate konserviert werden. Ein quantitativer Bindungsverlust von etwa 40 % ist dabei in Kauf zu nehmen, jedoch kein Verlust der Empfindlichkeit.

Kreuzreaktionen des LH-Rezeptors mit TSH, PRL, GH und FSH treten nur im Rahmen der Verunreinigung dieser HVL-Hormone mit LH auf. Die LH-Aktivität von HCG und PMSG wird auch im Rezeptortest bewiesen.

Der Gelbkörper war das einzige Organ vom Rind, aus dem nach dem angewendeten Präparationsverfahren spezifische LH-Rezeptoren gewonnen werden konnten, pro Gewichtseinheit jedoch weniger als aus dem Hoden der Ratte.

Eine immunologische Spezifität der Rezeptoren kann ausgeschlossen werden, da sie sowohl homologes als auch heterologes Gonadotropin binden.

Der Potenzvergleich verschiedener Hormonpräparationen mit LH-Aktivität stellte sich als einzige praktische Anwendungsmöglichkeit des Rezeptortests in der vorliegenden Form heraus, während er zur LH-Bestimmung im Rinderblut nicht geeignet ist.

S u m m a r y

The present work was undertaken to see whether a radioligand-receptor assay could be established as third basic method for the determination of LH in bovine blood, since the conventional measurement systems of the biotest in vivo or of radioimmuno assay are both limited.

Testis homogenate as well as the suspension of Leydig cells were examined. The homogenate of the rat testis is more suited to bind LH than the suspension of Leydig cells. The limits of measurement of this system range between 20 and 500 ng LH (NIH-LH-B₈). The binding properties can be enhanced by a higher receptor concentration, by increasing the the volume of the receptor suspension up to 2,5 ml and by lengthening the incubation time. They are impeded in lowering the pH (assays with pH 7,5 and 3,95), in increasing the incubation volume without increasing the receptor quantity and in adding serum at the incubation medium. Serum of various animals lowers the binding properties differently. It has been demonstrated that immunological activity cannot be compared with biological activity. HCG stands labelling better than LH.

The reproducibility depends first on the quality of the labelled hormone and secondly on individual differences of the rat testes.

The prepared testis homogenate can be kept frozen (-24 C) at least four months. A quantitative loss of binding activity of 40 % must be taken into account but no loss of sensitivity.

Cross-reactions of the LH-receptor with TSH, PRL, GH, and FSH only occur following a contamination of these hormones

with LH. The LH activity of HCG and PMSG have also been demonstrated in the receptor test.

The corpus luteum was the only organ of the bovine from which according to the method of preparation used, specific LH receptors could be obtained; and yet less than from the rat testis per weight unity.

An immunological specificity of the receptors can be excluded since they bind homologous as well as heterologous gonadotropins.

The potency estimates of different hormonal preparations with LH activity turned out to be the only practical use of the receptor assay in the present form while it is not suitable for LH determination in bovine blood.

5. Literaturverzeichnis

Adam, A., 1964

Quantitative Festimmung des gonadotropen Hormones
ICSH in Hypophysen einiger Tierarten
Dissertation München, med. vet.

Bitensky, M.W., Burnstein, S.R., 1965

Effects of cyclic adenosine monophosphate and melano-
cyte-stimulating hormone on frog skin in vitro
Nature 208, 1282

Braunstein, G.D., Reichert, L.E., Jr., Van Hall, E.V.,
Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T., 1971

The effects of desialylation on the biologic and im-
munologic activity of human pituitary luteinizing
hormone
Biochem. Biophys. Res. Comm. 242, 962

Butcher, R.W., Sutherland, E.W., 1962

Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials
I. Purification and properties of cyclic 3,5-nucleo-
tide phosphodiesterase and use of this enzyme to cha-
racterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine
J. Biol. Chem. 237, 1244

Catt, K.J., Dufau, M.L., Tsuruhara, T., 1971

Studies on a radioligand-receptor assay system for
luteinizing hormone and chorionic gonadotropin
J. Clin. Endocr. 32, 860

Catt, K.J., Dufau, M.L., Tsuruhara, T., 1972 a

Radioligand-receptor assay of luteinizing hormone and
chorionic gonadotropin
J. Clin. Endocr. 34, 123

- Catt, K.J., Tsuruhara, T., Dufau, M.L., 1972 b
Gonadotropin binding sites of the rat testis
Biochim. Biophys. Acta 279, 194
- Cuatrecasas, P., 1969
Interaction of insulin with the cell membrane: The
primary action of insulin
Proc. Nat. Acad. Sci. 63, 450
- Cuatrecasas, P., 1971
Properties of the insulin receptor of isolated fat
cell membranes
J. Biol. Chem. 246, 7265
- Cuatrecasas, P., Desbuquois, B., Krug, F., 1971
Insulin-receptor interactions in liver cell membranes
Biochem. Biophys. Res. Comm. 44, 333
- Davoren, P.R., Sutherland, E.W., 1963
The cellular location of adenylcyclase in the pigeon
erythrocyte
J. Biol. Chem. 238, 3016
- De Kretser, D.M., Catt, K.J., Burger, H.C., Smith, C.G.,
1969
Radioautographic studies on the localization of
¹²⁵I-labelled human luteinizing and growth hormone in
immature male rats
J. Endocr. 43, 105
- De Kretser, D.M., Catt, K.J., Paulsen, C.A., 1971
Studies on the in vitro testicular binding of iodina-
ted luteinizing hormone in rats
Endocrinology 80, 332
- Dufau, M.L., Catt, K.J., Tsuruhara, T., 1971 a
Gonadotropin stimulation of testosterone production
by the rat testis in vitro
Biochim. Biophys. Acta 252, 574

- Dufau, M.L., Catt, K.J., Tsuruhara, T., 1971 b
Retention of in vitro biological activity by desialylated human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin
Biochem. Biophys. Res. Comm. 44, 1022
- Dufau, M.L., Catt, K.J., Tsuruhara, T., 1972
Biological activity of human chorionic gonadotropin released from testis binding sites
Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 2414
- Dumont, J.E., Willems, C., Van Sande, J., Nève, P., 1971
Regulation of the release of thyroid hormones: Role of cyclic AMP
Ann. N.Y. Acad. Sci. 185, 291
- Frowein, J., 1972
Wirkungsmechanismen von Hormonen aus molekularbiologischer Sicht
Dtsch. Med. Wochenschr. 49, 1918
- Gill, G.N., Garren, L.D., 1969
On the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone: The binding of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate to an adrenal cortical protein
Proc. Nat. Acad. Sci. 63, 512
- Gilman, A.G., Rall, T.W., 1966
Studies on the relation of cyclic 3',5'-AMP (CA) to TSH action in beef thyroid slices
Fed. Proc. 25, 617
- Goss, D.A., Lewis, J., 1964
Immunologic differentiation of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin in compounds of high purity
Endocrinology 74, 83

- Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S., 1963
Preparation of ^{131}I -labelled human growth hormone of
high specific radioactivity
Biochem. J. 89, 114
- Greep, R.O., Van Dyke, H.B., Chow, B.F., 1941
Use of anterior lobe of prostate in assay of metaketen-
trin
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 46, 644
- Haynes, R.C., 1958
The activation of adrenal phosphorylase by the adre-
nocorticotropic hormone
J. Biol. Chem. 233, 1220
- Haynes, R.C., Sutherland, E.W., Rall, T.W., 1960
The role of cyclic adenyl acid in hormone action
Recent Progr. Horm. Res. 16, 121
- Höfer, F., 1973
Wirkung eines synthetischen LH/FSH-Releasinghormons
auf die Freisetzung des Luteinisierungshormons und
auf die Ovarfunktion beim Rind
Dissertation München, med. vet.
- Kammerman, S., Canfield, R.E., Kolena, J., Channing, C.P.,
1972
The binding of iodinated hCG to porcine granulosa
cells
Endocrinology 91, 65
- Karg, H., 1957
Askorbinsäuredynamik im Ovar als Gonadotropinnachweis
Klin. Wochenschr. 35, 643
- Karg, H., Schams, D., Böhm, S., 1969
Vergleich von radioimmunologischen und biologischen
LH-Bestimmungen im Rinderblut
Symp. Dtsch. Ges. Endokrin. 15, 324

Karlson, P., 1967

Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 6. Aufl., S. 271

Kolb, E., 1967

Lehrbuch der Physiologie der Haustiere, 2. Aufl.

Korenman, S.G., Tulchinsky, D., Eaton, L.W., 1970

Radioligand procedures for estrogen assay in normal and pregnancy plasma

In Diczfalusy, E., (ed.), Steroid Assay by Protein Binding, Stockholm, p. 291

Kuehl, F.A., Jr., Patanelli, D.J., Tarnoff, J., Humes, J.L., 1970

Testicular adenyl cyclase: Stimulation by the pituitary gonadotrophins

Biol. Repr. 2, 154

Lee, C.Y., Ryan, R.J., 1971

The uptake of human luteinizing hormone (hLH) by slices of luteinized rat ovaries

Endocrinology 89, 1515

Lefkowitz, R.J., Roth, J., Pastan, I., 1970

Radioreceptor assay of adrenocorticotrophic hormone: New approach to assay of polypeptide hormones in plasma

Science 170, 633

Lefkowitz, R.J., Roth, J., Pastan, I., 1971

ACTH-receptor interaction in the adrenal: A model for the initial step in the action of hormones that stimulate adenyl cyclase

Ann. N.Y. Acad. Sci. 185, 195

Leidenberger, F.A., Reichert, L.E., Jr., 1972 a

Studies on the uptake of human chorionic gonadotropin and its subunits by rat testicular homogenates

Endocrinology 91, 135

- Leidenberger, F.A., Reichert, L.E., Jr., 1972 b
Evaluation of a rat testis homogenate radioligand receptor assay for human pituitary LH
Endocrinology 91, 901
- Leidenberger, F.A., Trowbridge, C.G., Reichert, L.E., Jr., 1973
LH-receptor kinetics
J. Biol. Chem., im Druck
- Leyendecker, G., Wildt, L., Nocke, W., 1973
Radioligand receptor assay for the determination of LH and HCG activities utilizing rat ovarian receptors
Acta endocr. (Kbh.), Suppl. 173, 62
- Lipkin, D., Cook, W.H., Markham, R., 1959
Adenosine-3':5'-phosphoric acid: A proof of structure
J. Am. Chem. Soc. 81, 6198
- Makman, M.H., Sutherland, E.W., 1964
Use of liver adenyl cyclase for assay of glucagon in human gastro-intestinal tract and pancreas
Endocrinology 75, 127
- Marsh, J.M., Butcher, R.W., Savard, K., Sutherland, E.W., 1966
The stimulatory effect of luteinizing hormone on adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in corpus luteum slices
J. Biol. Chem. 241, 5436
- Marsh, J.M., 1970
The stimulatory effect of prostaglandin E_2 on adenyl cyclase in the bovine corpus luteum
FEBS letters 7, 283

Means, A.R., Vaitukaitis, J.L., 1972

Peptide hormone "receptors": Specific binding of ^3H -FSH to testis

Endocrinology 90, 39

Orloff, J., Handler, J., 1967

The role of adenosine 3',5'-phosphate in action of antidiuretic hormone

Am. J. Med. 42, 757

Parlow, A.F., 1958

A rapid bioassay method for LH and factors stimulating LH-secrections

Fed. Proc. 7, 402

Rajaniemi, H., Vanha-Perttula, T., 1972

Specific receptor for LH in the ovary: Evidence by autoradiography and tissue fractionation

Endocrinology 90, 1

Rall, T.W., Sutherland, E.W., Berthet, J., 1957

The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase; IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates

J. Biol. Chem. 224, 463

Reichert, L.E., Jr., Treadwell, P.L.E., 1967

Cross-reactivity of antibody to human and bovine luteinizing hormone with homologous and heterologous LH

Endocrinology 81, 591

Robison, G.A., Butcher, R.W., Sutherland, E.W., 1967

Adenyl cyclase as an adrenergic receptor

Ann. N.Y. Acad. Sci. 139, 703

Schams, D., 1972

Untersuchungen über Prolaktin beim Rind
Habilitationsschrift, Technische Universität München-
Weihenstephan

Shahani, S.K., Rao, S.S., 1964

Immunochemical and biological similarity between human luteinizing hormone and one of the antigenic components of human chorionic gonadotropin
Acta endocrin. 46, 317

Shiu, R.P.C., Kelly, P.A., Friesen, H.G., 1973

Radioreceptor assay for prolactin and other lactogenic hormones
Science 180, 968

Sutherland, E.W., Rall, T.W., 1957

The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg^{++} , and epinephrine or glucagon
J. Am. Chem. Soc. 79, 3608

Sutherland, E.W., Rall, T.W., 1958

Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles
J. Biol. Chem. 232, 1077

Sutherland, E.W., Øye, I., Butcher, R.W., 1965

The action of epinephrine and the role of the adenyl cyclase system in hormone action
Recent Progr. Horm. Res. 21, 623

Sutherland, E.W., Robison, G.A., 1966

The role of cyclic-3',5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones
Pharmacol. Rev. 18, 145

Sutherland, E.W., 1972

Studies on the mechanism of hormone action
Science 177, 401

Tillinger, K.G., 1957

Testicular morphology

Acta Endocrin., Suppl. XXX

Van Hall, E.V., Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T., Hickman,
J.W., Ashwell, G., 1971 a

Effects of progressive desialylation on the rate of
disappearance of immunoreactive HCG from plasma in
rats

Endocrinology 89, 11.

Van Hall, E.V., Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T., Hickman,
J.W., Ashwell, G., 1971 b

Immunological and biological activity of HCG follo-
wing progressive desialylation

Endocrinology 88, 456

Yalow, R.S., Berson, S.A., 1969

Assay of plasma insulin in human subjects by immuno-
logical methods

Nature 21, 1648

Herrn Professor Dr. Heinrich Karg möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas, seine wissenschaftlichen Anregungen, sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut meinen besonderen Dank ausdrücken. Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Priv. Doz. Dr. Dieter Schams für die labortechnische Einarbeitung und die zahlreichen Ratschläge und Diskussionen, Frau Erna Eschenbach und Herrn Jakob Oberpriller für die Anfertigung der Abbildungen und nicht zuletzt Frau Anni Reinhardt für ihre Übersetzungsarbeit.

L e b e n s l a u f

Am 16. Februar 1947 wurde ich, Rudolf Schindlmayr, als zweites Kind des Architekten Eugen Schindlmayr und seiner Ehefrau Else in Eichstätt geboren. Ab September 1953 besuchte ich die Volksschule, ab September 1957 das humanistische Gymnasium in Eichstätt, wo ich im Sommer 1966 das Abitur ablegte. Im Wintersemester 1966/67 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Universität München, das ich im Herbst 1971 mit dem Staatsexamen abschloß. Von Januar bis Dezember 1972 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie der Süddeutschen Versuchungs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weihenstephan der Technischen Universität München angestellt und erledigte während dieser Zeit den praktischen Teil der vorliegenden Dissertation.

